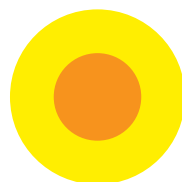


DOUTORAMENTO
MEDICINA DENTÁRIA

Estudo do biofilme supra- e subgengival em pacientes com periodontite

Luzia Mendes

D
2015





ESTUDO DO BIOFILME SUPRA- E SUBGENGIVAL EM PACIENTES COM PERIODONTITE

Luzia Mendes

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto para a obtenção do grau de Doutor em Medicina Dentária.

Elaborada sob orientação de:

Professor Doutor Miguel Gonçalves Pinto, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.

E sob coorientação de:

Professor Doutor António Felino, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

e

Doutor Nuno Filipe Azevedo, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

Porto, setembro 2015

Parcialmente financiada por:

Fundos FEDER através do Programa Operacional Fatores de Competitividade - COMPETE, ON.2 O Novo Norte - Programa Operacional Regional do Norte de Portugal [NORTE-07-0124-FEDER-000025-RL2_ Ambiente e Saúde]; e fundos nacionais através da FCT - Fundação para a Ciência e Tecnologia sob o projeto 'DNA mimics' [Pest-C / EQB / UI0511, PIC / IC / 82815/2007, SFRH / BDE / 51910/2012, SFRH /BD / 82663/2011].

Membros do Conselho Científico

Prof. Doutor Afonso Manuel Pinhão Ferreira

Prof. Doutor António Cabral de Campos Felino

Prof. Doutor António Marcelo Azevedo Miranda

Prof. Doutora Ana Paula Coelho Macedo Augusto

Prof. Doutor César Fernando Coelho Leal da Silva

Prof. Doutor Filipe Poças Almeida Coimbra

Prof. Doutor Germano Neves Pinto Rocha

Prof. Doutora Irene Graça Azevedo Pina Vaz

Prof. Doutora Inês Alexandra Costa Morais Caldas

Prof. Doutor João Carlos Antunes Sampaio Fernandes

Prof. Doutor João Fernando Costa Carvalho

Prof. Doutor José António Macedo Carvalho Capelas

Prof. Doutor Manuel José Fontes de Carvalho

Prof. Doutora Maria Benedita A. G. S. Maia Marques

Prof. Doutora Maria Cristina P. C. M. Figueiredo Pollmann

Prof. Doutora Maria Helena Guimarães Figueiral da Silva

Prof. Doutora Maria Helena Raposo Fernandes

Prof. Doutora Maria de Lurdes Ferreira Lobo Pereira

Prof. Doutor Mário Jorge Rebolho Fernandes da Silva

Prof. Doutor Mário Ramalho Vasconcelos

Prof. Doutor Miguel Fernando Silva Gonçalves Pinto

Prof. Doutor Paulo Rui Galvão Ribeiro Melo

Prof. Doutor Pedro Manuel Vasconcelos Mesquita

Prof. Doutor Pedro de Sousa Gomes

Prof. Doutor Ricardo Manuel C. L. Faria de Almeida

Professores Jubilados ou Reformados

Prof. Doutor Adão Fernando Pereira

Prof. Dr. Amílcar Almeida Oliveira

Prof. Doutor António Manuel Guerra Capelas

Prof. Dr. António Manuel Machado Capelas †

Prof. Doutor Durval Belo Moreira

Prof. Doutor Fernando José Brandão Martins Peres †

Prof. Doutor Francisco António Rebelo Morais Caldas

Prof. Doutor José Carlos Pina Almeida Rebelo

Prof. Doutor José Serra Silva Campos Neves

Prof. Doutor Manuel Desport Marques †

Prof. Dr. Manuel Guedes Figueiredo

Prof. Doutor Manuel Pedro Fonseca Paulo

Prof. Doutora Maria Adelaide Macedo Carvalho Capelas

Prof. Doutor Rogério Serapião Aguiar Branco

Ao Américo

| RESUMO

A cavidade oral acomoda uma flora microbiana muito heterogênea que se organiza, na superfície do dente, em comunidades polimicrobianas complexas, chamadas biofilmes. Ainda que os biofilmes exibam uma atitude genericamente comensal, a acumulação de depósitos bacterianos na superfície dentária exacerba a resposta inflamatória periodontal por forma a corresponder ao desafio microbiano. Contudo, essa forma de organização dificulta a resposta do hospedeiro tornando essenciais as intervenções mecânicas e químicas sobre o biofilme no controlo das doenças associadas à placa bacteriana.

O primeiro estudo realizado, um ensaio clínico randomizado, *crossover* e duplamente cego, utilizando um modelo de mau hálito matinal em voluntários saudáveis, teve como objetivo a comparação do efeito redutor de dois colutórios antibacterianos orais, com ou sem controlo mecânico prévio da placa bacteriana, nos níveis de compostos sulfurados voláteis (CSV), marcadores substitutos do metabolismo bacteriano. Este estudo mostrou que a instrumentação mecânica, *per se*, não tinha um impacto significativo na redução de CSV, nem potenciava significativamente a ação dos colutórios com ação antimicrobiana e neutralizante do odor. A ação química de ambos os colutórios mostrou-se similar na redução significativa de CSV que persistiu por pelo menos 5 horas.

O estabelecimento de terapias mais eficazes contra as doenças associadas à placa bacteriana passa inevitavelmente pela melhor compreensão da organização e sucessão microbiana nos biofilmes e da sua interação com o hospedeiro. A compreensão dos fenómenos etiopatogénicos associados à periodontite, assume particular importância pelo seu carácter irreversível e pela morbilidade que lhe está associada. A invasão dos tecidos periodontais tem sido recorrentemente apontada como fator chave na disrupção do equilíbrio microbiota-hospedeiro, fenómeno que está na base da periodontite. Nesse sentido, foi elaborada uma revisão sistemática por forma a determinar o nível de evidência científica existente sobre a relação entre a invasão do periodonto por patogénicos periodontais e as doenças periodontais. Após a pesquisa sistemática, até janeiro de 2014, nas bases de dados Medline, PubMed, Cochrane-central, ISI Web of Knowledge e SCOPUS foram incluídos 3 estudos caso-controlo que compararam a presença de bactérias, intracelulares ou aderentes às células epiteliais, em bolsas periodontais *versus* sulcos gengivais saudáveis. O desenho caso-controlo (observacional) de todos os estudos incluídos, o reduzido número de estudos, a

heterogeneidade metodológica e os dados imprecisos ou escassos determinaram o perfil de muito baixa qualidade de evidência. Demonstrou-se que não existe evidência científica suficiente para suportar ou excluir a invasão de patogénicos periodontais como um passo chave na etiopatogénese da doença periodontal.

Para a clarificação desta relação é essencial visualizar, discriminar, localizar e quantificar uma flora polimicrobiana intragengival de forma reprodutível, rápida e pouco onerosa. Para tal, foram desenvolvidas duas sondas de ácido peptídico nucleico (PNA) para a identificação e co-localização de *Porphyromonas gingivalis* (PgPNA1007) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (AaPNA235) na placa sub-gengival e em biópsias de tecidos gengivais, pelo método de hibridação *in situ* fluorescente (FISH). Superando algumas das limitações das sondas convencionais de DNA, as sondas de PNA trazem robustez e maior sensibilidade e especificidade à técnica de FISH convencional. A análise *in silico* determinou uma sensibilidade e especificidade de 100% para a sonda PgPNA1007 e 100% de sensibilidade e 99,9% de especificidade para a sonda AaPNA235. As melhores condições de hibridação foram encontradas a 59°C, durante 150 min. Ademais, as sondas desenvolvidas permitiram observar, pela primeira vez, a distribuição espacial simultânea destas espécies em biópsias de tecido gengival organizado, pelo método de FISH. Para clarificar a organização e sucessão microbiana nos biofilmes e sua interação com o hospedeiro, bem como a resposta às intervenções mecânicas e químicas, mais estudos são necessários, para os quais apresentamos uma técnica molecular com grandes potencialidades.

| ABSTRACT

The oral cavity accommodates a very heterogeneous microbial flora which organizes itself in complex polymicrobial communities, called biofilms, on the tooth surface. Although biofilms are generally commensal, the accumulation of bacterial deposits on the tooth surface exacerbates the periodontal inflammatory response to the increased microbial challenge. However, as this form of organization hinders the host response, external mechanical and chemical interventions on the biofilm have become essential in the control of plaque associated diseases.

Our first study is a randomized, crossover, double-blind clinical trial using a morning bad breath model with healthy volunteers. We aimed to compare the effect of two oral antibacterial mouthrinses on the volatile sulfur compounds (VSC) levels, products of bacterial metabolism, and evaluate the role of the mechanical plaque control when performed prior to mouthrinse use. Our study showed that mechanical instrumentation, *per se*, did not have a significant impact in reducing VSC, nor significantly potentiated the action of mouthrinses with antimicrobial activity and a neutralizing odor effect. The chemical action of both mouthrinses showed a similar significant reduction in VSC, which persisted for at least 5 hours.

The development of more effective therapies against plaque associated diseases is inevitably dependent on a better understanding of microbial organization and succession in biofilms and their interaction with the host. A deeper understanding of the etiopathogenesis of periodontitis is particularly important given its irreversible nature and significant morbidity. Invasion of periodontal tissues by bacteria has been repeatedly pointed out as a potential triggering mechanism that disrupts the microbiota-host balance, leading to periodontitis. Accordingly, the second study was a systematic review conducted in order to determine the level of existing scientific evidence on the relationship between periodontal invasion, by periodontal pathogens, and periodontal diseases. After a systematic search of Medline, PubMed, Cochrane-central, ISI Web of Knowledge and SCOPUS databases, up to January 2014, 3 case-control studies comparing the presence of intracellular or adherent bacteria to epithelial cells from periodontal pockets versus healthy gingival sulci, were included. The case-control design (observational) of all included studies, the small number of studies, the methodological heterogeneity and inaccurate or sparse data determined a very low quality profile of evidence. The scientific evidence produced to date is, therefore, insufficient to support or exclude the invasion of periodontal pathogens as a key step in the etiopathogenesis of periodontal disease.

The ability to identify, discriminate, locate and quantify a polymicrobial intragingival flora in a reproducible, fast and cost-effective way is essential to be able to clarify this relationship. For that reason, we developed two PNA probes to identify and co-locate *P. gingivalis* (PgPNA1007) and *A. actinomycetemcomitans* (AaPNA235) in subgingival plaque and gingival tissue biopsies by the FISH method. The PNA probes overcome some of the limitations of conventional DNA probes bringing robustness and greater sensitivity and specificity to conventional FISH technique. The *in silico* analysis determined 100% sensitivity and specificity for PgPNA1007 probe and 100% sensitivity and 99.9% specificity for AaPNA235 probe. The optimum hybridization conditions were found at 59 °C for 150 minutes. With our probes it was possible to observe, for the first time, the simultaneous spatial distribution of these species in gingival tissue biopsies, by FISH method. To clarify the organization and microbial succession in biofilms and their interaction with the host, as well as the response to mechanical and chemical interventions, further studies are required, for which we present a molecular technique with great potential.

| AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Miguel Pinto por me ter lançado o desafio do doutoramento e pelo incentivo e suporte constantes que me permitiram crescer no mundo da investigação. O seu saber, conselhos e orientação na investigação, na docência e na clínica têm sido inestimáveis. A amizade e a partilha dos últimos anos merecem o meu mais profundo reconhecimento e agradecimento.

Ao Doutor Nuno Azevedo que me recebeu de braços abertos e me deu a oportunidade de me juntar ao seu grupo de investigação tendo sido sempre compreensivo perante as singularidades de uma médica dentista num laboratório de biologia molecular. O seu apoio, motivação e partilha de conhecimentos foram essenciais na conclusão desta tese.

Ao Professor Doutor António Felino pela partilha de um saber de experiências feito e pela mais-valia que acrescentou ao projeto pelas sempre pertinentes observações e profícuas sugestões.

À Professora Doutora Mariana Henriques pela incansável dedicação e pela generosidade que demonstrou desde o primeiro dia abrindo portas e apontando caminhos que me permitiram chegar a bom porto.

À Andreia, ao Rui, à Sílvia, à Doutora Carina Almeida, ao Doutor Nuno Guimarães e todos no LEPABE por tantas vezes terem posto as minhas dúvidas à frente do seu trabalho.

| ABREVIATURAS

AIQ Intervalo interquartis
CAL Perda de aderência
CHX Clorohexidina
CLASI *Combinatorial labeling and spectral imaging*
CMP Controle mecânico de placa bacteriana
CPC Cloreto de cetilpiridínio
CSV Compostos sulfurados voláteis
DNA Ácido desoxirribonucleico
DP Desvio padrão
ELISA *Enzyme-linked immunosorbent assay*
FISH Hibridação *in situ* fluorescente
GBC Contagem global de bactérias
HPS Hemorragia após sondagem
ICAM-1 Molécula de adesão intracelular-1
IgA Imunoglobulina A
IgG Imunoglobulina G
IgM Imunoglobulina M
IL-12 Interleucina-12
IL-1 α Interleucina-1 α
IL-1 β Interleucina-1 β
IL-8 Interleucina-8
LPS Lipopolissacarídeo
MMP-1 Metaloproteinase da matriz-1
MMP-8 Metaloproteinase da matriz-8
MMPS Metaloproteinases
NCBI *National Center for Biotechnology*
ORG Pontuação organolética
Pb Pares de bases
PCR Reação de polimerase em cadeia
PGE₂ Prostaglandina E₂
PMN Polimorfonucleares neutrófilos
PNA Ácido peptídico nucleico
PPB Partes por bilhão
PPD Profundidade de sondagem
RDP *Ribosomal Database Project*
RNA Ácido ribonucleico
rRNA Ácido ribonucleico ribossômico
spp. Espécies
TLR2 *Toll-like receptor 2*
TLR4 *Toll-like receptor 4*
Tm Temperatura de *melting*
TNF- α Fator de necrose tumoral- α
TSA *Trypticase soy agar*
TSBV *Trypticase soy bacitracina vancomicina*
VIH Vírus da imunodeficiência adquirida
VSC *Volatile sulfur compounds*
Zn Zinco

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	14
Apresentações clínicas de um periodonto saudável (A), gengivite (B) e periodontite (C).	
FIGURA 2	20
Representação esquemática do biofilme subgengival na interface dento-epitelial. BS - biofilme subgengival e CE - células epiteliais. (A) Microcolónias de <i>Porphyromonas gingivalis</i> (amarelo) na camada mais superior do biofilme subgengival. (reproduzido com permissão de Zijng V, 2010a). (B) <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> intracelular (seta verde) (reproduzido com permissão de Rudney 2005a).	
FIGURA 3	29
Representação esquemática da aplicação do método de hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH) a uma amostra polimicrobiana. Adaptado de Amann R, 2008.	
FIGURA 4	30
Estrutura química das cadeias de DNA e PNA. A - adenina, C - citosina, G - guanina e T - timina, Θ carga negativa. Adaptado de http://www.biomers.net (último acesso julho 2015)	
E1 FIGURA 1	43
Fluxograma do recrutamento de voluntários e desenho do estudo.	
E2 FIGURA 1	55
Fluxograma da pesquisa bibliográfica e seleção dos estudos.	
E3 FIGURA 1	69
Esquema da localização das sequências alvo de cada sonda. A estrutura secundária do RNA da subunidade pequena do ribossoma foi adaptado de http://www.rna.icmb.utexas.edu/ (último acesso julho de 2015).	
E3 FIGURA 2	71
Alinhamento parcial de sequências 16S rRNA de bactérias com uma diferença num par de bases com as sondas AaPNA235 e PgPNA1007. Os números da coluna da direita indicam a posição de hibridação.	
E3 FIGURA 3	73
Imagem de culturas puras de (A) <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (vermelho) e (B) <i>Porphyromonas gingivalis</i> (verde) após PNA-FISH e microscopia epifluorescente. Painéis (C) e (D) mostram os controlos negativos de <i>A. actinomycetemcomitans</i> e <i>P. gingivalis</i> , respetivamente.	
E3 FIGURA 4	74
Imagens de <i>multiplex</i> PNA-FISH numa suspensão com duas espécies. O painel (A) mostra <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (filtro vermelho), o painel (B) mostra <i>Porphyromonas gingivalis</i> (filtro verde) e o painel (C) mostra as imagens, do mesmo campo, sobrepostas.	
E3 FIGURA 5	75
Imagem da deteção de <i>Porphyromonas gingivalis</i> após PNA-FISH e microscopia epifluorescente numa amostra de placa subgengival (A) e numa biópsia gengival (B). Note-se a invasão celular de <i>P. gingivalis</i> (seta verde) em pormenor no painel (C).	
E3 FIGURA 6	76
Imagens de <i>multiplex</i> PNA-FISH em biópsia gengival. O painel com filtro verde (A) mostra a presença de <i>Porphyromonas gingivalis</i> (seta verde), o painel com filtro vermelho (B) mostra a presença de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (seta vermelha), e o painel (C) mostra as imagens, do mesmo campo, sobrepostas.	

| ÍNDICE DE TABELAS

E1 TABELA 1	44
Caracterização da amostra de voluntários	
E1 TABELA 2	46
Níveis de CSV (ppb) na <i>baseline</i> , 1 h, 3h, 5h (média±DP) por grupo.	
E1 TABELA 3	47
Níveis de CSV (ppb) na <i>baseline</i> , 1 h, 3h, 5h (média±DP) por grupo e percentagem máxima de alteração (%C CSV) por colutório.	
E1 TABELA 4	47
Pontuação organolética na <i>baseline</i> , 1h, 3h, 5h (mediana [AIQ (25°-75° percentil)]) por colutório.	
E2 TABELA 1	56
Características dos estudos incluídos na revisão sistemática.	
E2 TABELA 2	60
Avaliação da qualidade dos estudos incluídos na revisão sistemática	
E3 TABELA 1	70
Sensibilidade e especificidade teórica das sondas de PNA ou DNA para a deteção de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> e <i>Porphyromonas gingivalis</i> .	
E3 TABELA 2	72
Resultado dos testes de sensibilidade e especificidade das sondas de PNA para o <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> e <i>Porphyromonas gingivalis</i> desenvolvidas neste estudo.	

| ÍNDICE

RESUMO	XI
ABSTRACT	XIII
AGRADECIMENTOS	XVII
ABREVIATURAS	XIX
ÍNDICE DE FIGURAS	XXI
ÍNDICE DE TABELAS	XXII
ÍNDICE	XXIII
CAPÍTULO 1 CONTEXTO E OBJETIVOS	01
Contexto	03
Objetivos	08
CAPÍTULO 2 INTRODUÇÃO	11
1. As singularidades da cavidade oral	13
2. Doenças periodontais associadas à placa bacteriana	13
2.1. Mau hálito ou halitose	14
3. Modelo de patogénese periodontal	15
4. Diagnóstico de gengivite e periodontite	18
5. Biofilme dentário	19
5.1. Biofilme e doença periodontal	20
5.1.1. Organização e sucessão microbiana na superfície dentária	21
5.2. Invasão bacteriana dos tecidos periodontais	22
5.3. <i>Porphyromonas gingivalis</i> e <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	23
6. Métodos de deteção microbiana em amostras complexas	24
6.1. Métodos de identificação <i>in situ</i> de microrganismos	28
6.1.1. Hibridação <i>in situ</i> fluorescente	28
7. O ácido peptídico nucleico	31
7.1. Sondas de PNA	31

CAPÍTULO 3 INVESTIGAÇÃO	35
Estrutura do capítulo	37
E1 Efeito comparativo de um novo colutório contendo clorhexidina, triclosan e zinco na redução de compostos sulfurados voláteis: um estudo randomizado, crossover e duplamente cego	39
Material e métodos	41
Resultados	44
Discussão	48
Conclusão	50
E2 Relação entre a invasão do periodonto por patogénicos periodontais e a doença periodontal: uma revisão sistemática	51
Métodos	53
Resultados	57
Discussão	60
Conclusão	62
E3 Nova estratégia para detetar e localizar patogénicos periodontais: a técnica de PNA-FISH	63
Material e métodos	65
Resultados	68
Discussão	77
Conclusão	79
Agradecimentos	79
CAPÍTULO 4 DISCUSSÃO FINAL	81
Considerações metodológicas	83
Considerações microbiológicas	85
Considerações clínicas	86
CAPÍTULO 5 CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS	89
BIBLIOGRAFIA	93
ANEXO	113

1.

CONTEXTO E OBJETIVOS

| CONTEXTO

A confrontação com a complexidade e multidimensionalidade das doenças periodontais tem motivado as ciências biológicas básicas para uma investigação constante na área, almejando que cada novo achado possa contribuir para a compreensão detalhada deste grupo de patologias. De facto, nos últimos 50 anos, a evolução dos conceitos acerca das doenças periodontais tem acompanhado os avanços na microbiologia, bioquímica, imunologia, biologia molecular e genética. A escolha do trabalho a desenvolver, ao longo deste programa doutoral, assentou na reconhecida mais-valia da estreita colaboração entre clínicos e investigadores das ciências biológicas básicas tendo-se focado nas doenças periodontais associadas ao biofilme, mais concretamente nas periodontites crónica e agressiva. O mau hálito (ou halitose), embora não seja considerado uma verdadeira entidade nosológica, pela sua etiologia bacteriana em íntima relação com o biofilme periodontal, constituiu também objeto de estudo deste trabalho.

É amplamente reconhecido que a periodontite, nas suas formas crónica e agressiva, resulta de um desequilíbrio entre a microbiota subgengival e as defesas do hospedeiro, em indivíduos suscetíveis (Sanz M, 2011). Nos últimos anos, o estudo da inflamação e de outros mecanismos imunitários assumiu uma posição de maior destaque na equação hospedeiro-microbiota. E, embora fundamental para a compreensão dos fenómenos que conduzem à iniciação e progressão das doenças periodontais, esta alteração no foco da equação tem sido, por vezes, erradamente interpretada como evidência de um papel menos relevante da microbiota na etiologia das doenças periodontais (Teles R, 2013).

A relevância da microbiota na etiopatogenia da doença periodontal assumiu o seu expoente máximo no final da década de 80. Ainda que alguns estudos do final do século XIX tenham proposto uma natureza infecciosa para as doenças periodontais, são os trabalhos do fim dos anos 60 e durante a década de 70 os responsáveis por uma verdadeira mudança de paradigma.

Entre meados dos anos 20 e o início da década de 60 as doenças periodontais eram comumente divididas em inflamatórias ou degenerativas (Armitage GC, 2002).

A designação de doenças periodontais inflamatórias estava reservada à gengivite e à periodontite. Ambas se encontravam associadas à presença de irritantes locais como a presença de 'matéria alba', cálculos e restaurações transbordantes. A impactação alimentar, o trauma oclusal, as deficiências nutricionais e fatores sistémicos desconhecidos eram também apontados como importantes agentes etiológicos.

As doenças degenerativas como a ‘gengivose’ tinham por base certas doenças virais, doenças vesiculobulhosas e reações alérgicas. A designação de ‘periodontose’ era reservada para situações onde se observava a rápida perda de tecidos periodontais em pacientes relativamente jovens não se enquadrando, à data, nas doenças inflamatórias pela quase inexistência de sinais clínicos de inflamação e pela escassa quantidade de irritantes locais presentes (Armitage GC, 2013).

A aceitação de uma natureza infecciosa na base das doenças periodontais ressurgiu, então, a partir da década de 60. Para tal, contribuíram uma série de estudos transversais que sugeriam uma íntima associação entre a quantidade de depósitos microbianos na superfície do dente e a extensão e gravidade da inflamação gengival (Socransky SS, 1994a). Particular importância foi atribuída aos estudos de Løe *et al.*, em 1965-1968, que demonstraram que a gengiva clinicamente saudável iria desenvolver gengivite na ausência de medidas de higiene oral, e que a gengivite reverteria assim que a higiene oral fosse retomada (Løe H, 1965; Theilade E, 1966). A realidade observada com a chamada ‘gengivite experimental’ foi corroborada em estudos subsequentes onde foi possível observar a reversibilidade e a prevenção da recorrência da gengivite naturalmente ocorrida quando se implementavam medidas para a remoção mecânica da placa bacteriana na superfície dentária (Moore LVH, 1987; Savitt ED, 1984; Slots J, 1978). Ficaram assim estabelecidas as bases para a *non-specific plaque hypotesis* segundo a qual a acumulação bacteriana junto à margem gengival causaria inflamação gengival e posterior destruição dos tecidos periodontais. Essa destruição resultaria da ação direta de produtos tóxicos libertados pela microbiota presente na placa bacteriana (Bartold PM, 2013).

Ora, enquanto este conceito é genericamente válido para explicar o desenvolvimento de gengivite, não explica adequadamente o estabelecimento de periodontite. Vários estudos epidemiológicos subsequentes constataram que a ausência de tratamento da gengivite não culminava obrigatoriamente no desenvolvimento de periodontite (Page RC, 1997). Além disso, a manifestação agressiva e avançada de periodontite em determinados indivíduos com reduzida quantidade de placa bacteriana visível também não podia ser explicada pela *non-specific plaque hypotesis* (Socransky SS, 1994a).

Em meados da década de 70 começou a esboçar-se uma nova mudança de paradigma após a publicação de estudos nos quais se demonstrava que a flora cultivável, predominantemente constituída por bacilos anaeróbios gram-negativos, encontrada em bolsas periodontais profundas contrastava com a flora, maioritariamente composta por cocos gram-positivos, dos sulcos gengivais saudáveis dos mesmos indivíduos (Newman MG, 1976; Slots J, 1976). Na presença de uma resposta presumivelmente constante do hospedeiro estas observações eram inconsistentes com o facto de que

toda a flora era igualmente patogénica.

A ideia de especificidade na etiologia das doenças periodontais lançou uma era extremamente prolífica no estudo da microbiologia periodontal que se focou no esclarecimento do papel de várias espécies, colonizadoras do espaço subgengival, na saúde e na doença. A *specific plaque hypothesis* sobrepôs-se à *non-specific plaque hypothesis*. Como resultado, muito do esforço na época foi canalizado para a identificação dos microrganismos responsáveis pelas diversas doenças periodontais, particularmente pela ‘periodontose’. A identificação de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (atualmente *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) como um possível agente patogénico responsável pela ‘periodontose’ motivou a alteração da designação para periodontite juvenil (atualmente periodontite agressiva localizada) (Ranney RR, 1977; Slots J, 1980).

Vários possíveis patogénicos periodontais foram entretanto propostos dos quais se destacam até hoje *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia*.

Ao mesmo tempo que o papel da microbiota periodontal era cada vez mais consolidado numa série de estudos (Evian CI, 1982; Savitt ED, 1984; Slots J, 1986; Socransky SS, 1994a) outros procuraram esclarecer os fenómenos inflamatórios/imunológicos relacionados com as doenças periodontais. Destacaram-se os trabalhos de Page *et al.* (1981) donde emerge o conceito de que a maior parte da destruição observada na periodontite é causada por uma resposta do hospedeiro à presença de comunidades microbianas bem organizadas no espaço subgengival. Page reforçou a ideia de que a gengivite pode permanecer contida e não progredir, a menos que outro fator (desconhecido) altere o equilíbrio microbiota-hospedeiro no sentido de provocar a destruição tecidular típica das lesões avançadas.

No final da década de 80, é consensual entre a comunidade científica que as doenças periodontais, particularmente a periodontite, resultam da interação infeção/resposta do hospedeiro. Desde então, a investigação produzida na área da Periodontologia assenta na confirmação e melhor esclarecimento desta interação (Teles R, 2013).

No início dos anos 90, surgiram conceitos ecológicos para tentar explicar a dinâmica entre a microbiota e a resposta do hospedeiro, que Marsh (1994) resumizou na *ecologic plaque hypothesis*. Esta teoria propõe que as alterações da homeostasia do ambiente subgengival provocadas pela acumulação de placa bacteriana e consequente inflamação tecidular condicionam o crescimento bacteriano, favorecendo o aumento de uma flora ‘patogénica’ em detrimento de uma flora ‘comensal’. O aumento de bactérias proteolíticas gram-negativas leva, por sua vez, a mais inflamação e destruição tecidular,

num ciclo vicioso que culmina na seleção de uma flora maioritariamente patogénica associada a um elevado grau de dano tecidular.

Esta visão surgiu em paralelo com a aceitação de que a periodontite é uma infeção causada por biofilmes. A compreensão de um modo de organização bacteriano em comunidades complexas, compostas por várias espécies e com sofisticados meios de comunicação, veio direcionar o foco de atenção não para a presença e proporção de determinadas espécies, mas para as alterações no biofilme como um todo. Não obstante, e apesar da importância do biofilme como um todo, nem todos os elementos de um biofilme patogénico parecem ter a mesma importância na etiopatogenia da periodontite. Além disso, apesar de eventualmente detetáveis na comunidade, algumas espécies bacterianas poderão estar constrangidas por uma comunidade bacteriana não associada com doença (Marsh PD, 2011).

A partir da década de 90, o recurso a técnicas de biologia molecular permitiu não só melhorar a identificação dos putativos patogénicos periodontais, mas também identificar estirpes mais virulentas. As técnicas clássicas de cultura microbiana, usadas até então, são extremamente laboriosas e demoradas sendo elas próprias limitativas do trabalho que se consegue produzir (Dzink JL, 1988; Haffajee AD, 1994). As técnicas de biologia molecular como *DNA-DNA checkerboard*, reação de polimerase em cadeia (PCR), *real time* PCR, ou hibridação *in situ* permitem, por sua vez, a identificação de várias espécies em simultâneo e a análise de várias amostras por indivíduo de forma rápida e com uma boa relação custo-benefício (Paster BJ, 2009). Para além disso, estima-se que 35% a 50% das espécies que constituem a placa bacteriana permanecem incultiváveis (Wade W, 2002; Dewhirst FE, 2010), o que constitui um viés de análise. É óbvio que esta limitação não é só imputável às técnicas de cultura microbiana, mas também às técnicas de biologia molecular que tipicamente se focam na identificação de grupos de bactérias determinados (e cultiváveis) (Ashimoto A, 1996; Socransky SS, 1998; Sakamoto M, 2001; Al-Ahmad A, 2007). Contudo, algumas técnicas de biologia molecular permitem uma abordagem *open-ended culture-independent* que ultrapassa essa limitação. Ao amplificar áreas de um gene bacteriano ubiquitário (gene 16S do RNA ribossómico (rRNA)) por uma técnica como a de PCR é possível a identificação dos grupos taxonómicos microbianos presentes numa dada amostra (Greisen K, 1994) e, em última instância, novas espécies pertencentes ao segmento incultivável (Paster BJ, 2001).

O recurso a técnicas *open-ended culture-independent* causou uma considerável expansão da diversidade da microbiota subgengival, com novos agentes a surgirem como putativos patogénicos periodontais. Contudo, o mais interessante resultado da aplicação destas técnicas foi a deteção pouco frequente de reconhecidos patogénicos periodontais (Socransky SS, 2005) contrariando décadas de estudos microbiológicos.

Esta aparente contradição pode ser explicada pelas limitações inerentes às técnicas *open-ended* que podem, hipoteticamente, alterar os perfis da amostra em estudo como: a assumpção que o uso de *primers* universais é capaz de amplificar o DNA de todas as espécies bacterianas com a mesma eficiência; a existência de falhas de ligação de pares de bases (*mismatches*) entre a sequência do *primer* e a sequência do organismo alvo; a dificuldade de amplificação inerente a genomas com elevada concentração de guanina+citosina; as diferentes composições da parede celular bacteriana que afetam a lise celular e a extração de DNA; e, aspetos relacionados com a amplificação na técnica de PCR em amostras polimicrobianas (concentração de *template*, número de ciclos de amplificação, temperatura de hibridação e formação de quimeras). Para além disso, a constituição de grupos de estudo heterogêneos com a inclusão de diferentes entidades nosológicas e a junção de amostras colhidas de vários sulcos e bolsas periodontais, ainda que do mesmo indivíduo, podem ter tornado menos nítidas as diferenças existentes entre saúde e doença (Diaz PI, 2012; Teles R, 2013).

Se por um lado estas limitações justificam a leitura cautelosa dos achados que apontam para uma potencial irrelevância dos agentes patogénicos periodontais clássicos, por outro lado, estes enquadram-se à luz do conceito de ‘patogénico chave’ de Hajishengallis *et al.* (2012).

Hajishengallis serve-se do exemplo da *P. gingivalis*, a mais fácil de cultivar do complexo vermelho e também, por isso, a mais bem estudada, para clarificar um aparente paradoxo. Apesar de estar fortemente associada com a doença (Socranski SS, 1998), a *P. gingivalis* é um constituinte minoritário dos biofilmes associados com a periodontite (Doungudomdacha S, 2000, Kumar PS, 2006) e não apresenta características habitualmente associadas com as bactérias que contribuem para uma doença inflamatória.

Num estudo recente, Hajishengallis (2011) observou que a *P. gingivalis* tem a capacidade de enfraquecer a imunidade inata facilitando a colonização inicial, o crescimento e alteração da composição da microbiota periodontal, ao mesmo tempo que, tem os mecanismos necessários para invadir os tecidos periodontais e permanecer numa localização intracelular nutricionalmente favorável, protegida do sistema imunitário e resistente à eliminação pelos métodos mecânicos convencionais de terapia periodontal, perpetuando a cronicidade da doença (Lamont RJ, 1998; Darveu RP, 2012). Esta capacidade de influenciar a comunidade microbiana e romper o equilíbrio microbiota-hospedeiro, ao mesmo tempo que é um constituinte minoritário da microbiota subgingival, encorajou a sua caracterização como ‘patogénico chave’ na etiopatogenia da periodontite.

Contudo, e apesar de serem recorrentes na literatura comentários que apontam para

uma destruição dos tecidos periodontais despoletada pela penetração de bactérias ou antigénios bacterianos através do epitélio juncional ou epitélio da bolsa até ao tecido conjuntivo, a verdade é que nunca foi adequadamente explicado, comparando pacientes com e sem periodontite, como é que isto acontece contra o fluxo permanente do fluído crevicular e a barreira de neutrófilos em migração em direção ao biofilme subgengival, nem objetivamente demonstrada a relevância deste passo na iniciação e/ou progressão da periodontite. Embora surpreendente, a ausência de publicações pode significar a existência de resultados negativos desapontantes (Bartold PM, 2013). Algumas limitações relacionadas com as técnicas de imunohistoquímica e das técnicas de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) para a identificação de bactérias *in situ* podem ter desencorajado a prossecução de alguns destes estudos.

Estudos recentes, comparando a invasão de células epiteliais removidas do epitélio das bolsas periodontais *versus* sulcos gengivais, pela técnica de FISH, não foram capazes de demonstrar diferenças significativas entre saúde e doença (Colombo AV, 2007). Uma limitação destes estudos é a demonstração da invasão bacteriana apenas em células descamadas da superfície epitelial e não em biópsias de tecido gengival. De facto, a ausência de um grande estudo comparativo, com a aplicação da técnica de FISH, em biópsias de tecidos gengivais poderá dever-se à dificuldade de hibridação das sondas de DNA em amostras tecidulares mais complexas. Uma nova técnica de FISH com utilização de sondas de ácido peptídico nucleico (PNA) veio obviar algumas das limitações da técnica de FISH convencional (Cerqueira L, 2008) e tem o potencial para abrir novas perspetivas na compreensão da relevância da invasão dos tecidos periodontais na etiopatogenia da periodontite.

| OBJETIVOS

A presente tese conducente ao grau de doutor assenta no estudo do biofilme supra e subgengival por forma a tentar contribuir para o melhor conhecimento de alguns aspetos relacionados com a etiopatogenia da periodontite, nomeadamente a relevância da organização bacteriana em biofilmes e o papel da invasão bacteriana, de determinadas estirpes que compõem o biofilme subgengival, no desequilíbrio entre a microbiota e o hospedeiro na iniciação, progressão e cronicidade da doença periodontal.

Mais concretamente, foram traçados três objetivos principais que tinham como fim último a resposta a algumas questões concretas e pertinentes neste âmbito de investigação e a introdução de novos avanços no estudo do biofilme periodontal.

1. Avaliar clinicamente a eficácia de métodos mecânicos e químicos sobre o biofilme oral.

- a. Qual a eficácia da disrupção do biofilme oral por instrumentação mecânica na redução de compostos sulfurados voláteis (CSV)?
- b. Será que a disrupção do biofilme oral, prévia ao uso de colutórios antimicrobianos, potencia a eficácia dos mesmos na redução de CSV?

2. Determinar o nível de evidência científica existente sobre a relação entre a invasão do periodonto por patogênicos periodontais e as doenças periodontais.

- a. Qual a relação que existe entre a qualidade ou quantidade de putativos patogênicos periodontais nos tecidos periodontais e a doença periodontal?

3. Desenvolver uma nova estratégia de identificação in situ respeitadora da organização tridimensional dos patogênicos periodontais organizados em biofilmes e internalizados nos tecidos periodontais.

- a. Desenvolvimento de sondas de PNA com elevada sensibilidade e especificidade para a identificação e localização de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*, em simultâneo (*multiplex* PNA-FISH).
- b. Otimização da técnica de PNA-FISH para permitir a identificação e localização de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*, no biofilme subgengival.
- c. Otimização da técnica de PNA-FISH para permitir a identificação e localização de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*, em biópsias de tecido gengival.

2.

INTRODUÇÃO

| INTRODUÇÃO

1. AS SINGULARIDADES DA CAVIDADE ORAL

Em destaque na face humana, a cavidade oral assume um papel indiscutível na harmonia visual e nas relações interpessoais não só pela estética do sorriso ou capacidade de fonação mas também pela mímica de expressões e sentimentos. Do ponto de vista fisiológico, a cavidade oral representa o início do processo digestivo com a trituração dos alimentos e ação enzimática sobre o bolo alimentar. Do ponto de vista anatômico, representa a porta de entrada dos alimentos e uma extensão do meio externo para o interior do corpo humano, o que condiciona uma colonização microbiana permanente. A cavidade oral proporciona um ambiente favorável capaz de suportar o crescimento de uma comunidade microbiana muito heterogênea. Mais acresce que a existência de diferentes *habitats* e de superfícies não descamativas permite uma organização complexa da microbiota, sem igual no corpo humano (Marsh PD, 2011). Não é de estranhar, portanto, que a microbiota oral, ainda que habitualmente em equilíbrio com o hospedeiro, represente, como um todo, o fator etiológico comum às principais afeções da cavidade oral: cárie dentária (Simón-Soro A, 2014), doença periodontal (Sanz M, 2011) e halitose (Loesche WJ, 2002). A halitose, ou mau hálito, embora não seja considerada como uma verdadeira entidade nosológica, tem na sua elevada prevalência e implicações na saúde e bem-estar do indivíduo como ser social (Scully C, 2008) a justificação para a sua abordagem como tal.

2. DOENÇAS PERIODONTAIS ASSOCIADAS À PLACA BACTERIANA

As doenças periodontais são um vasto conjunto de patologias que afetam o periodonto e cuja classificação segue as determinações do *workshop* internacional de 1999 da Academia Americana de Periodontologia. Face aos objetivos deste trabalho, a referência futura a doenças periodontais estará limitada às doenças associadas à placa bacteriana com maior expressão em todo mundo (i.e., gengivite e periodontites crónica e agressiva) (Burt B, 2005).

Num periodonto saudável, a gengiva está firmemente aderida ao dente e tem uma coloração rosa pálido, contorno festonado, textura pontilhada e não apresenta hemorragia com a mastigação ou com a higiene oral (Armitage GC, 2004b). A colonização bacteriana da superfície dentária é inevitável e estabelece um desafio microbiano permanente com consequente resposta inflamatória, que enquanto autolimitada e subclínica faz parte, pela sua ubiquidade, da gengiva clinicamente normal (Bosshardt CC, 2005).

Na ausência de métodos de higiene oral adequados a placa bacteriana acumula-se na superfície dentária e acentua o desafio microbiano desencadeando uma resposta inflamatória pronunciada, mas limitada aos tecidos gengivais, denominada gengivite. Na gengivite, a gengiva encontra-se avermelhada, edemaciada com alteração do contorno e hemorragia fácil evidenciando os sinais cardinais de inflamação (Armitage GC, 2004b). A gengivite é reversível com adequado controlo de placa bacteriana (Løe H, 1965; Theilade E, 1966; Moore LVH, 1987; Savitt ED, 1984; Slots J, 1978). Porém, quando não tratada, e apesar de poder permanecer estável e limitada à gengiva por tempo indeterminado, a resposta do hospedeiro pode intensificar-se causando lesão tecidual irreversível, com perda de substância, nos tecidos periodontais, i.e., periodontite (Page RC, 1981; Page RC, 1997).

Clinicamente, a periodontite evidencia-se pela presença de bolsas periodontais e/ou recessão gengival associadas ou não a hemorragia após sondagem (HPS), supuração, mobilidade dentária e migração dentária (Armitage GC, 2004a). A gengivite e a periodontite são doenças infecciosas crônicas cuja interação microbiota-hospedeiro determina o curso e a extensão da doença.

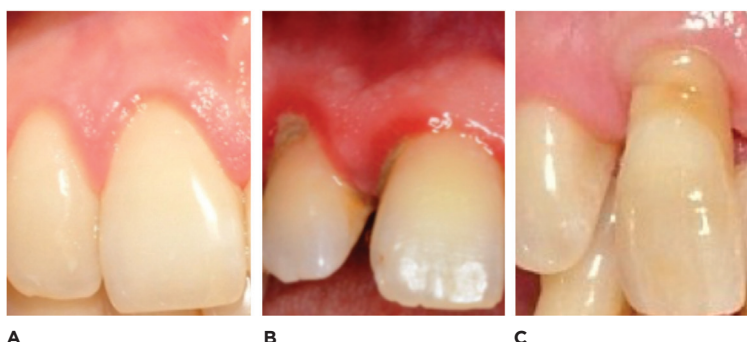


FIGURA 1. Apresentações clínicas de um periodonto saudável (**A**), gengivite (**B**) e periodontite (**C**).

2.1. Mau hálito ou halitose

O mau hálito, ou halitose, é um odor desagradável e incomodativo no ar exalado. Embora a halitose possa derivar de doenças sistêmicas (Moshkowitz M, 2007; Besouw M, 2007; Souza CM, 2008; Murata T, 2003), é universalmente aceite que a principal fonte de mau hálito são os compostos odoríferos voláteis, particularmente os CSV, produzidos na cavidade oral (Delanghe G, 1997 e 1999). Como principais componentes do mau odor oral, os CSV, principalmente o sulfureto de hidrogénio, o metilmercaptano e em menor extensão o sulfureto de dimetilo (Tonzetich J, 1976; Tangerman A, 2007), estão significativamente associados com a intensidade do mau hálito detetado clinicamente. Formam-se pela degradação bacteriana dos aminoácidos cisteína, cistina e metionina presentes nos restos alimentares, células descamadas, fluído crevicular, saliva, placa bacteriana e sangue. Estão implicadas neste processo bactérias orais anaeróbias gram-negativas, pela sua conhecida capacidade proteolítica (Loesche WJ, 2002).

Uma vez que as principais bactérias associadas com a gengivite e a periodontite são anaeróbias gram-negativas proteolíticas, é biologicamente plausível a existência de uma possível correlação entre os níveis de CSV e a gravidade da doença periodontal. Por exemplo, as proteínases subgengivais mais bem estudadas são as *gingipains* da *P. gingivalis* (O'Brien-Simpson NM, 2003). Estas proteínases são capazes de degradar o colagénio tipo I e IV, mas também os fatores do complemento C3 e C5 e as imunoglobulinas IgG, IgA e IgM, diminuindo assim, a atividade antibacteriana dos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) (ver adiante) (Fletcher J, 1998; Lamont RJ, 1998). Estes péptidos e aminoácidos produzidos extracelularmente são transferidos para o interior da bactéria e descarboxilados ou desaminados libertando-se, sulfureto de hidrogénio, sulfureto de dimetilo e metilmecaptano como subprodutos do metabolismos (Yoshimura M, 2000; Nakano Y, 2002). Porém, nem todos os pacientes com periodontite ou gengivite apresentam mau hálito, e vice-versa (Bosy A, 1994). Isto poderá observar-se porque os CSV detetados clinicamente provêm mais provavelmente da flora do dorso da língua do que da placa bacteriana nas bolsas periodontais, dado que estas se encontram virtualmente fechadas e apresentam poucas trocas gasosas com o ar expirado (Loesche WJ, 2002). Não obstante, um estudo de Tsai *et al.* mostrou uma correlação significativa entre percentagem de HPS e os níveis de CSV, sugerindo que o estado inflamatório é o principal fator responsável pelo mau hálito associado às doenças periodontais (Tsai CC, 2008). Assim, o sangue e o fluido crevicular constituem um importante substrato proteico que quando degradados pela flora oral anaeróbia gram-negativa podem contribuir para a produção de CSV (Loesche WJ, 2002).

O sucesso das intervenções anti-halitose parece depender da redução dos níveis de CSV por métodos mecânicos ou químicos. As intervenções mecânicas (i.e., escovagem, uso do fio dentário e raspagem da língua) visam reduzir o número de bactérias que produzem CSV e o substrato, enquanto as intervenções químicas, veiculadas em pasta dentífrica e colutórios, têm um efeito antibacteriano, além da neutralização direta do odor (Quirynen M, 2002; Danser MM, 2003).

3. MODELO DE PATOGÉNESE PERIODONTAL

A interface dos tecidos periodontais com o dente está estruturalmente especializada para se adaptar ao desafio microbiano constante. Em condições ideais, e na ausência de colonização bacteriana, existiria um selo epitelial em torno do dente que se estenderia da margem da gengiva até à junção esmalte-cimento, medindo aproximadamente 2mm em altura. Contudo, na cavidade oral, o desafio microbiano é permanente. Como consequência, a porção mais coronal do epitélio de junção, i.e. epitélio da face interna da gengiva voltado para o dente, descola da superfície dentária formando um pequeno sulco, denominado sulco gengival, cuja presença ubiqüitária o torna parte da gengiva 'cl clinicamente normal' (Bosshardt DD, 2005; Schroeder H, 1997).

Histologicamente, o epitélio de junção é um epitélio pavimentoso estratificado não-queratinizado de forma afunilada com cerca de 10 a 30 linhas celulares de espessura coronalmente, i.e. junto ao fundo do sulco gengival, e apenas 1 a 3 camadas celulares de espessura na sua terminação apical, i.e. junto à junção esmalte-cimento. Tal como qualquer outro epitélio encontra-se unido ao tecido conjuntivo subjacente pela lâmina basal. Mas é a existência de uma segunda lâmina basal voltada para o dente, a lâmina basal interna, intimamente conectada, via hemidesmossomas, com as células mais internas do epitélio de junção, que lhe confere características únicas de selo epitelial contra a colonização bacteriana. Para além disso, o epitélio de junção apresenta células entreunidas por relativamente poucos desmossomas e largos espaços intercelulares, quando comparado com outros epitélios orais (Shimono M, 2003; Bosshardt DD, 2005). Estas características ultraestruturais conferem-lhe não só capacidade para acomodar uma linha de defesa composta por neutrófilos, macrófagos, linfócitos e ainda, células apresentadoras de antigénios, como uma permeabilidade extraordinária que possibilita um fluxo permanente de exsudado vascular em direção à interface dento-epitelial. Este exsudado vascular arrasta consigo células inflamatórias e outros componentes do sistema imunitário decorrentes da resposta inflamatória constante constituindo, assim, um exsudado inflamatório, denominado fluido crevicular. O fluido crevicular está presente na gengiva clinicamente normal e faz parte da homeostasia da interface dento-epitelial constituindo um importante mecanismo de defesa inata (Pollanen MT, 2003; Schroeder H, 2003).

Perante o acumular de placa bacteriana na superfície dentária o equilíbrio homeostático rompe-se e intensifica-se a reação inflamatória em resposta. Resumidamente, os produtos bacterianos estimulam as células epiteliais a aumentar a expressão de interleucina-8 (IL-8) e de molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1), intensificando o sinal quimiotático para os PMN residentes, em direção ao sulco gengival. Os PMN têm uma função fagocitária não específica constituindo a primeira linha de defesa contra os patogénicos periodontais (Tonetti MS, 1998). Simultaneamente, a via alternativa do complemento é ativada aumentando a expressão de anafilotoxinas C3a e C5a. Os mastócitos residentes respondem rapidamente ao aumento de C3a libertando uma série de sinais inflamatórios como a histamina, que contribui para a vasodilatação típica da resposta inflamatória, mas também a interleucina-1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (Walsh LJ, 2003). Estes últimos, juntamente com C5a e o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, estimulam as células endoteliais a expressar IL-8, P-selectina e E-selectina, essenciais para o recrutamento e migração transendotelial de mais PMN, em circulação, para os tecidos (Marshall JS, 2002). Esta resposta inicial (2-4 dias) à deposição de placa bacteriana corresponde ao primeiro estágio (lesão inicial) de gengivite definido por Page e Schroeder (1976). As alterações não são clinicamente perceptíveis e não existe ainda dano tecidular.

Com a manutenção do estímulo bacteriano, a lesão inflamatória evolui para o segundo estágio (lesão precoce) em cerca de 1 semana. Na lesão precoce, o epitélio de junção

fica densamente infiltrado com PMN e começa a desenvolver cristas epiteliais. As alterações no meio decorrentes da agressão e da resposta do hospedeiro condicionam, agora, a expressão de diferentes citocinas que estimulam a quimiotaxia de monócitos e linfócitos para o local da agressão. Nesta fase, os macrófagos estimulados pelo LPS bacteriano não só libertam mediadores inflamatórios, como a interleucina-1 α (IL-1 α), IL-1 β , prostaglandina E₂ (PGE₂), TNF- α (Page RC, 1991) que perpetuam a resposta inflamatória, como participam na apresentação antigénica, juntamente com as células dendríticas, despoletando a resposta humoral. Isto traduz-se na presença de um infiltrado leucocitário no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio de junção, constituído maioritariamente por linfócitos T mas também alguns linfócitos B, típico da lesão precoce de gengivite (Payne WA, 1975). Ainda nesta fase, observa-se alguma destruição do colagénio tecidual em torno do infiltrado inflamatório decorrente não só da ação das metaloproteínases da matriz (MMPs), libertadas pelas células residentes (MMP-1) e pelo infiltrado de PMN (MMP-8), mas também devido à diminuição da produção de colagénio pelos fibroblastos que começam agora a mostrar alterações citotóxicas (Reynolds JJ, 1997).

Na ausência de remoção do fator causal, a gengivite evolui para o terceiro estágio (lesão estabelecida) caracterizada por congestão vascular e predomínio de linfócitos B e plasmócitos no infiltrado leucocitário subjacente ao epitélio de junção e profundamente no tecido conjuntivo. Intensifica-se a destruição do colagénio e o epitélio de junção projeta-se cada vez mais para o tecido conjuntivo ao mesmo tempo que se observa o alargamento dos espaços intercelulares e aumento da permeabilidade epitelial. Clinicamente, estas alterações histológicas refletem-se numa gengiva de coloração vermelho-azulada, edemaciada e com alterações do contorno e consistência. A lesão estabelecida de gengivite pode reverter, estabilizar durante meses ou anos, ou evoluir para lesão destrutiva com perda irreversível de suporte periodontal (Page RC, 1976; Seymour GJ, 1983a e b).

A evolução da gengivite para periodontite caracteriza-se pela degeneração tecidual com perda significativa de colagénio, que se tinha iniciado no estágio anterior (diminuição da produção pelos fibroblastos e ação de MMPs) mas também pela fagocitose, por fibroblastos, das fibras de colagénio na interface cimento-ligamento periodontal (Deporter DA, 1980; Reynolds JJ, 1997). Em resultado, as células mais apicais do epitélio de junção proliferam para apical ao longo da raiz. O infiltrado leucocitário atinge nesta fase mais de metade do volume do epitélio de junção e do tecido conjuntivo subjacente originando perda de coesão estrutural tecidual: a porção mais coronal do epitélio de junção descola da superfície dentária e o sulco gengival aprofunda-se gradualmente (Listgarten MA, 1986). Paralelamente, o osso alveolar é reabsorvido em resultado da ativação osteoclástica no local. A modulação da remodelação óssea é condicionada pela presença de IL-1, PGE₂ e TNF- α que suprimem a atividade osteoblástica e estimulam a atividade osteoclástica no local (Schwartz Z, 1997). Fica assim estabelecida a bolsa

periodontal, criando-se uma área onde a remoção de placa bacteriana está dificultada propiciando um *feedback* positivo constante.

4. DIAGNÓSTICO DE GENGIVITE E PERIODONTITE

Apesar dos avanços registados nas áreas da microbiologia, genética e biologia molecular, a verdade é que nos últimos 30 anos não ocorreram quaisquer mudanças conceptuais no que diz respeito ao diagnóstico periodontal (Armitage GC, 2013).

A identificação da doença periodontal depende da interpretação dos sinais e sintomas colhidos aquando da anamnese e exame clínico. O diagnóstico de periodontite assenta essencialmente na deteção de perda de aderência clínica. A perda de aderência clínica traduz a migração apical da aderência epitelial sobre a raiz dentária acompanhada de perda de tecido conjuntivo e osso alveolar. Determina-se clinicamente pela medição da distância entre a junção esmalte-cimento e o fundo do sulco ou bolsa periodontal sondável, com uma sonda periodontal graduada. O diagnóstico de gengivite está tradicionalmente reservado a pacientes com sinais clínicos de inflamação gengival e sem perda de suporte periodontal. Porém, a gengivite pode ocorrer em periodontos reduzidos, mas que no momento se encontram estáveis e sem evidência de progressão, embora apresentem inflamação gengival.

A maior parte dos pacientes com periodontite apresenta a forma crónica da doença. A periodontite crónica é mais prevalente na população adulta (Hugoson A, 2008) e apresenta tipicamente taxas de progressão lentas a moderadas, embora possa apresentar períodos de rápida destruição. É, também, evidente a consistência entre a quantidade de depósitos microbianos na superfície dentária e a gravidade da doença. Este último aspeto é muito importante no diagnóstico diferencial entre as formas crónica e agressiva da doença, mas não anula o facto da presença de abundantes depósitos bacterianos não ser, *per se*, o fator que determina a evolução de gengivite para periodontite.

De facto, a impossibilidade de estabelecer uma relação causal entre a quantidade de placa bacteriana supra ou subgengival e a extensão, gravidade ou progressão da periodontite, levanta várias questões relacionadas com o mecanismo ou patogénico disruptor da homeostasia, com a suscetibilidade individual e com a existência de fatores de risco (Page RC, 1997; Kornman KS, 2008). É atualmente aceite que a progressão da periodontite pode ser modificada pela presença de fatores comportamentais e doenças sistémicas, como o consumo tabágico, infeção por VIH e Diabetes mellitus (Palmer RM, 2005; Salvi GE, 2008, Genco RJ, 2013).

A gravidade da periodontite crónica é habitualmente categorizada de acordo com a

perda de aderência (CAL) ocorrida: leve (1-2mm), moderada (3-4mm) e grave (≥ 5 mm). As formas generalizada e localizada são em tudo semelhantes na etiopatogênese dependendo a designação da percentagem de dentes afetados (maior ou menor que 30%).

A periodontite agressiva é menos frequente que a periodontite crônica e apresenta tipicamente uma taxa de progressão rápida, em pacientes globalmente saudáveis, com uma quantidade de depósitos microbianos inconsistente com a gravidade da doença e com elevada proporção de *A. actinomycetemcomitans* relativamente à restante flora. Muitas vezes, a doença afeta vários familiares próximos e pode estar associada a anormalidades fagocitárias e a fenótipos de macrófagos hiperreativos com elevada produção de PGE_2 e IL-1 β em resposta a endotoxinas bacterianas. Ao contrário da periodontite crônica, as formas localizada e generalizada não se resumem a diferenças na extensão da doença. A periodontite agressiva localizada é tipicamente diagnosticada durante a puberdade em pacientes com destruição periodontal nas zonas interproximais dos primeiros molares e incisivos e parece apresentar elevada produção de anticorpos contra os agentes infecciosos. A periodontite agressiva generalizada afeta pelo menos 3 dentes para além dos primeiros molares e incisivos em adultos jovens e, ao contrário da forma localizada, parece cursar com baixa produção de anticorpos contra os agentes infecciosos (Nagy RJ, 2006).

5. BIOFILME DENTÁRIO

A cavidade oral agrega em si diversos ecossistemas. Os dentes, a língua e as mucosas constituem diferentes superfícies que as bactérias podem colonizar explorando as ótimas condições para o seu crescimento como humidade, temperatura e acesso a nutrientes constantes (Sissons CH, 1997). Os dentes são *habitats* de excelência para a colonização bacteriana por se tratarem de superfícies não descamativas, onde as bactérias podem aderir e organizar-se em biofilmes escapando, mais eficazmente, aos mecanismos de remoção pelo hospedeiro e exibindo maior tolerância a agentes antimicrobianos, quando comparados com o modo de vida planctónico (Armitage GC, 2009; Mah TF, 2001).

Contrariando uma visão clássica de rápida colonização do espaço subgingival por putativos patogénicos periodontais logo após a instrumentação periodontal, a organização da microbiota periodontal em comunidades complexas corrobora a noção de que a disrupção do biofilme e consequentes alterações no ecossistema podem retardar a maturação num biofilme mais patogénico, evitando ou protelando a recorrência da doença.

O biofilme dentário é definido como uma comunidade microbiana que se desenvolve

na superfície dentária rodeada por uma matriz de polímeros de origem bacteriana e salivar. Estruturalmente o biofilme compreende uma superfície onde possa permanecer aderido, a comunidade bacteriana em si e uma rede interna canalicular que permite a passagem de nutrientes, remoção de produtos de metabolização e transporte de células para o interior e exterior do biofilme (Marsh PD, 2011). Os biofilmes são estruturas dinâmicas onde ocorrem fenômenos de despreendimento permitindo que as bactérias se separem, se transfirmam e se fixem num local diferente (Kolenbrander PE, 2006).

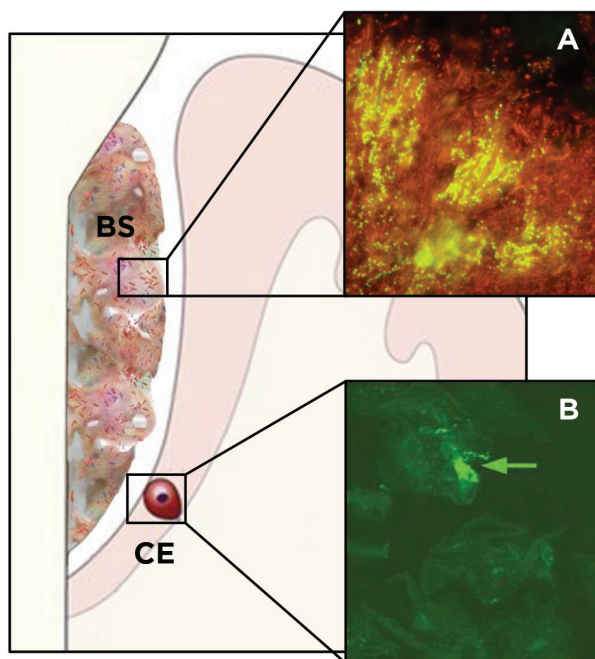


FIGURA 2. Representação esquemática do biofilme subgengival na interface dento-epitelial. **BS** - biofilme subgengival e **CE** - células epiteliais. **(A)** Microcolônias de *Porphyromonas gingivalis* (amarelo) na camada mais superior do biofilme subgengival (reproduzido com permissão de Zijne V, 2010a). **(B)** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* intracelular (seta verde) (reproduzido com permissão de Rudney JD, 2005a).

5.1. Biofilme e doença periodontal

O conhecimento adquirido ao longo de décadas de estudos microbiológicos permitiu compreender que algumas espécies parecem estar mais frequentemente associadas com doença e que a organização e sucessão microbiana dentro dos biofilmes não são aleatórias. Em 1998, Socransky e colaboradores realizaram um dos estudos de referência da microbiologia periodontal. Após a análise microbiológica de mais de 1300 amostras de placa subgengival foi elaborado um modelo de organização da microbiota subgengival e sua relação com a doença periodontal. O modelo foi construído com base na frequência de ocorrência simultânea de um grupo taxonômico, independentemente da sua distribuição espacial no biofilme. Foram descritos seis grupos, ou complexos, bacterianos intimamente interrelacionados e que sugerem uma sucessão bacteriana desde os colonizadores iniciais aos tardios. Por exemplo, os complexos constituídos por colonizadores iniciais da superfície dentária precedem

habitualmente a colonização pelos complexos laranja (*Fusobacterium spp.*, *Prevotella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Eubacterium nodatum* e *Streptococcus constellatus*) e vermelho (*P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*). E, é raro encontrar bactérias pertencentes ao complexo vermelho na ausência do complexo laranja (Bartold PM, 2013). Assim, os colonizadores iniciais constituem os complexos amarelo (*Streptococcus spp.*), azul (*Actinomyces spp.*) ou roxo (*Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*) e os colonizadores tardios, ou secundários, integram os complexos verde, laranja e vermelho. O complexo verde inclui *Eikenella corrodens*, *A. actinomycetemcomitans* serotipo a e *Capnocytophaga spp.* O complexo vermelho foi considerado o auge da comunidade, estando os seus elementos significativamente associados com as alterações clínicas típicas da periodontite.

5.1.1 Organização e sucessão microbiana na superfície dentária

Ao compilar o conhecimento obtido por uma série de estudos, *in vitro* e *in vivo*, sobre co-agregação bacteriana, Kolenbrander e colaboradores elaboraram um modelo de colonização, sucessão e distribuição espacial da microbiota na superfície dentária (Kolenbrander PE, 2004). Resumidamente, a formação de biofilme na superfície dentária inicia-se pela formação da película aderida, i.e., uma fina camada de moléculas, maioritariamente proteínas, provenientes da saliva e do fluido crevicular (Marsh PD, 2011). Esta película condiciona a superfície dentária permitindo a adesão microbiana, inicialmente de forma reversível, através de interações físico-químicas, e posteriormente, de forma irreversível, entre recetores presentes na película aderida e adesinas na superfície da célula bacteriana (Scannapieco FA, 1994; Marsh PD, 2011). Quando firmemente aderidas, o crescimento bacteriano inicia-se e as novas colónias bacterianas permanecem aderidas por mecanismos de coagregação bacteriana. A coagregação estabelece-se intraespécie mas também interespecie constituindo um mecanismo essencial na biodiversidade do biofilme supra e subgingival. Assim, a colonização bacteriana inicial resume-se à presença de gram-positivos anaeróbios facultativos, maioritariamente *Streptococcus spp.*, mas também *Actinomyces* e *Veillonella spp.*, que apresentam uma extensa coagregação intragénico. Algumas horas depois são já visíveis bacilos gram-negativos. A heterogeneidade do biofilme aumenta com o tempo e condiciona alterações no meio que permitem que espécies minoritárias no biofilme inicial possam crescer e tornar-se predominantes num biofilme maduro (Quirynen M, 2006).

Nos estádios mais tardios da formação do biofilme predomina a coagregação entre espécies gram-negativas, como as observadas entre *Fusobacterium nucleatum* e os vários elementos do complexo vermelho. De facto, a bactéria *F. nucleatum* parece ser um elemento chave para a maturação e diversidade do biofilme dentário dada a sua elevada prevalência nos biofilmes supragingivais maduros e subgingivais e a observação de que a maioria dos colonizadores tardios não estabelece coagregação

com os colonizadores iniciais, nem com outros colonizadores tardios, mas fá-lo com *F. nucleatum* (Kolenbrander PE, 2004). O biofilme subgengival aparenta-se com o biofilme supragengival maduro e resulta muito provavelmente da expansão deste para o sulco gengival onde é favorecido o crescimento das espécies pertencentes aos complexos laranja e vermelho (Socranski SS, 2005)

Estudos recentes, baseados em métodos moleculares, expandiram o número de espécies bacterianas encontradas nas comunidades iniciais e maduras, mas não alteraram o conceito global de modificação de uma flora predominantemente gram-positiva para gram-negativa (Zijngel V, 2010a; Socransky SS, 2005; Diaz PI, 2006; Kroes I, 1999).

5.2. Invasão bacteriana dos tecidos periodontais

Durante os últimos 50 anos, o papel da invasão bacteriana no complexo processo patogénico da periodontite atravessou ciclos de aceitação e rejeição. Desde Listgarten (1965) e as suas primeiras imagens de microscopia eletrónica de infiltração por espiroquetas nos tecidos gengivais, em pacientes com gengivite ulcerativa necrosante, que a invasão bacteriana emergiu como mecanismo potencialmente importante na iniciação e progressão da doença periodontal. Não é difícil de conjecturar que a presença de microrganismos no interior dos tecidos gengivais é negativa para o periodonto. A invasão tecidular permite a libertação direta de produtos bacterianos nocivos (Lamont RJ, 1998; Socransky SS, 1991; Curtis MA, 1999), e promove a libertação do conteúdo lisossomático dos neutrófilos nos tecidos periodontais (Van Dyke TE, 1984; Ding Y, 1997). Para além disso, as bactérias invasoras parecem ter mecanismos para escapar às defesas do hospedeiro. Para se proteger da vigilância imune humoral, as bactérias invasoras penetram e permanecem no interior das células epiteliais, num ambiente nutritivo, onde podem multiplicar-se e disseminar-se para as células vizinhas (Tribble GD, 2010). Adicionalmente, estudos *in vitro*, demonstraram que *P. gingivalis* impede a migração transepitelial dos neutrófilos e previne a secreção de IL-8 pelas células epiteliais na resposta ao desafio bacteriano (Darveau RP, 1998; Madianos PN, 1997). Vários estudos também sugeriram que as bactérias periodontais suprimem ativamente a imunidade mediada por células e isto, presumivelmente, contribui para o desenvolvimento da lesão periodontal (Gemmell E, 2007). O tratamento periodontal está também limitado *a priori*, uma vez que, é pouco provável que a raspagem e alisamento radicular sejam capazes de remover fisicamente as bactérias intracelulares (Johnson JD, 2008) e, além disso, as bactérias internalizadas são mais resistentes aos antimicrobianos (Eick S, 2004).

Embora exista uma base teórica para sustentar o papel da invasão bacteriana na etiopatogénese da doença periodontal, com estudos *in vitro* que suportam que as bactérias periodontais possuem a maquinaria molecular para efetuar a invasão

tecidual e iludir as defesas do hospedeiro (Tribble GD, 2010), foram realizados poucos estudos *in vivo* (Vitkov L, 2005; Manor A, 1984; Delacourt-Debruyne EM, 2000; Noiri Y, 1997) deixando a ideia em suspenso ao longo dos anos. A descoberta de putativos microrganismos patogénicos periodontais em sulcos gengivais saudáveis (Van Winkelhof AJ, 2002), a impossibilidade de discriminar doença periodontal por análise microbiológica (Mombelli A, 2002), a incapacidade de refutar categoricamente que as bactérias não foram artificialmente introduzidas nos tecidos durante a colheita e/ou processamento de amostras (Lamont RJ, 2002), e a presença de putativos microrganismos patogénicos periodontais em células epiteliais da mucosa oral de indivíduos com um periodonto saudável (Rudney JD, 2005 a e b), ajudaram a manter a dúvida.

5.3. *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A *P. gingivalis* é uma bactéria anaeróbia, pleomórfica (cocoide a cocobacilar) gram-negativa da família *Porphyromonadaceae*, ordem *Bacteroidales*, classe e filo *Bacteroidetes*. Forma colónias com pigmentação escura, em agar sangue, devido às suas propriedades hemolíticas e pode ser isolada com recurso a meios seletivos como o *Columbia blood agar* com bacitracina, ácido nalidíxico e colistina (Hunt DE, 1986). As propriedades invasivas e evasivas, que lhe têm sido atribuídas, fazem desta bactéria um importante putativo agente patogénico periodontal (Bostanci N, 2012). De facto, embora em termos relativos possa ser um constituinte minoritário da flora periodontal, é a espécie bacteriana mais associada com a forma crónica de doença periodontal (Yang HW, 2004). A *P. gingivalis* é capaz de invadir células epiteliais (Belton CM, 1999), por via da presença de fimbrias *major* tipo I (Lamont RJ, 1998; Amano A, 2004), e inibir a apoptose celular (Yilmaz O, 2008) perpetuando-se na lesão. Paralelamente, incapacita a primeira linha de defesa do hospedeiro ao degradar α/β -defensinas (Carlisle MD, 2009), ao resistir ao *stress* oxidativo (Mydel P, 2006) e à fagocitose (estirpes encapsuladas) pelos PMN (Sundqvist G, 1991), ao suprimir a ativação do complemento pela ação das *gingipains* (Schenkein HA, 1995; Wang M, 2010) e ao inibir a produção de IL-8 pelas células epiteliais (*chemokine paralysis*) (Darveau RP, 1998). Para além disso, inibe a produção de interleucina-12 (IL-12) pelos macrófagos evitando o reconhecimento das células epiteliais invadidas e consequentemente a ativação dos linfócitos T citotóxicos (Hajishengallis G, 2007), enganando assim a imunidade celular. Ademais, o LPS bacteriano da *P. gingivalis* não é um potente indutor da inflamação. Enquanto o lipídeo A da maioria das bactérias gram-negativas estimula o *toll-like receptor 4* (TLR4) das células imunes na libertação de citocinas pró-inflamatórias, o lipídeo A da *P. gingivalis* estimula predominantemente o *toll-like receptor 2* (TLR2) e pode até atuar como um antagonista do TLR4, atenuando a resposta imune (Darveau RP, 2004; Hajishengallis G, 2009).

A *A. actinomycetemcomitans* é uma bactéria cocobacilar gram-negativa, anaeróbia

facultativa que taxonomicamente pertence à família *Pasteurellaceae*, ordem *Pasteurellales*, classe *Gammaproteobacteria* e ao filo *Proteobacteria*. Forma colónias brancas opacas, não hemolíticas, em agar sangue. As colónias de estirpes fimbriadas possuem uma característica estrela central (Raja M, 2014). Pode ser isolada com recurso a meios seletivos como o meio TSBV (*trypticase soy* bacitracina vancomicina) e o meio Dentaïd-1 (*brain-heart infusion* com vancomicina) (Rurenga P, 2013). Não é um microrganismo patogénico obrigatório, podendo colonizar indivíduos com e sem doença periodontal, embora esteja fortemente associado com a periodontite agressiva localizada (Raja M, 2014). Cinco serotipos de *A. actinomycetemcomitans* (*a-f*) estão atualmente identificados. Os serotipos *a*, *b* e *c* são globalmente dominantes, os serotipos *d* e *e* são raros e a prevalência do serotipo *f* é, ainda, desconhecida. A correlação entre os diferentes serotipos e a doença periodontal permanece por clarificar (Brígido JA, 2014).

A capacidade de adesão e invasão do periodonto pela *A. actinomycetemcomitans* parecem ser essencial no sucesso deste microrganismo na colonização e destruição dos tecidos periodontais. De facto, a *A. actinomycetemcomitans* parece modular a resposta inflamatória pela produção de leucotoxina-A (capaz de abrir poros na superfície celular dos leucócitos) e supressão da resposta por IgG (Kuritai Ochiai T, 1992), para além de poder escapar à resposta do hospedeiro invadindo as células epiteliais (Lamont RJ, 2002) ao mesmo tempo que estimula a produção de IL-8 e ICAM-1, perpetuando a inflamação (Huang GT, 1998). Ademais, parece promover a reabsorção do osso alveolar pela ação do LPS bacteriano (Nishida E, 2001).

6. MÉTODOS DE DETEÇÃO MICROBIANA EM AMOSTRAS COMPLEXAS

A caracterização do biofilme periodontal assentou durante mais de um século nas técnicas de microscopia e de cultura microbiana. Se por um lado a microscopia tem o potencial de permitir a visualização da organização espacial e inter-relações físicas da microbiota, por outro lado apresenta grandes limitações na identificação microbiana em amostras complexas. A microscopia ótica apenas permite a discriminação macroestrutural das bactérias e a microscopia eletrónica, embora permita a visualização da ultraestrutura bacteriana, não fornece ainda discriminação suficiente para fazer identificações ao nível da espécie (Socranski SS, 2005). As técnicas convencionais de cultura permitem discriminar espécies bacterianas, mas dependem da capacidade de promover o crescimento bacteriano, em ambiente laboratorial, recorrendo a meios de cultura. A estratégia utilizada depende do tipo de microrganismo e da amostra a analisar. Classicamente, a microbiologia serve-se dos meios enriquecidos e dos meios seletivos para a cultura de microrganismos. Enquanto os primeiros são úteis para microrganismos de crescimento fastidioso, para

crescimento rápido de isolados ou para a detecção de microrganismos em amostras habitualmente estéreis, os segundos permitem um crescimento diferencial de um determinado microrganismo ou grupo de microrganismos em amostras com elevada percentagem de colonizadores. A identificação dos microrganismos em cultura é feita tendo em consideração a cor e a morfologia da colónia, a qual pode ser submetida a séries de testes bioquímicos e serológicos que permitem um diagnóstico diferencial (Harvey ARC, 2006).

Os métodos de cultura são um pilar fundamental da microbiologia e da periodontologia. Os estudos da microbiota periodontal que recorreram às técnicas de cultura microbiana constituem a base do atual conhecimento sobre a etiopatogénese das doenças periodontais, embora demorados, laboriosos e onerosos (Haffajee AD, 1988; Moore WEC, 1994; Dzink JL, 1988). A existência de pelo menos 150 a 200 espécies bacterianas diferentes no periodonto de cada indivíduo e o facto de a periodontite ser tipicamente uma doença de sítio, sendo possível que determinadas espécies possam colonizar apenas uma fração dos 168 sítios tipicamente avaliados, explica por si só a enorme limitação das técnicas de cultura no estudo das doenças periodontais (Teles R, 2013). Além disso, não permitem a detecção de espécies não cultiváveis ou que necessitam de condições especiais (enquanto) desconhecidas (Wyss C, 1989) e não são precisas na identificação de espécies que não se enquadram nos padrões típicos de avaliação bioquímica (Bittar F, 2008; Johnson G, 2006) podendo introduzir importantes viés de análise.

As limitações das técnicas convencionais de microscopia e de cultura bacteriana incentivaram o desenvolvimento de técnicas alternativas capazes de permitir a identificação microbiana de uma forma mais rápida e precisa. Os métodos imunológicos foram uma das primeiras alternativas aos métodos convencionais. As técnicas de imunofluorescência, *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) e imunohistoquímica foram aplicadas na identificação de algumas espécies bacterianas em amostras de placa bacteriana e tecidos gengivais (Gmur R, 1989; Gersdorf H, 1993; Noiri Y, 1997). Os métodos imunológicos assentam na reação antígeno-anticorpo, na qual o anticorpo se encontra marcado com uma molécula capaz de produzir um sinal mensurável. Esse sinal pode ser uma alteração de cor, alteração elétrica ou emissão de fluorescência. A designação do método reflete a técnica e a reação utilizada (Peruski AH, 2003). As técnicas de imunohistoquímica são particularmente úteis na identificação *in situ* de microrganismos uma vez que permitem a identificação de antígenos em cortes histológicos.

Os métodos imunológicos têm a vantagem de não dependerem dos tempos de cultura tornando-se mais rápidos e menos onerosos, mas apresentam sensibilidade e especificidade variável consequência da sua vulnerabilidade a inconsistências no processamento de amostras e a fenómenos de reatividade cruzada. Para além disso,

são técnicas difíceis de aplicar para avaliar múltiplas amostras polimicrobianas e a sua aplicação está condicionada aos *kits* de identificação, disponíveis para apenas algumas espécies, ou ao demorado processo de desenvolvimento e validação de anticorpos específicos para novas espécies (Socranski SS, 2005).

Não é de estranhar portanto o predomínio, nas últimas duas décadas, dos métodos baseados nos ácidos nucleicos no estudo da microbiologia periodontal. O material genético dos seres vivos é único e específico para cada espécie. O conhecimento de pelo menos parte da sequência de DNA permite o desenvolvimento de sequências de oligonucleotídeos que hibridizam especificamente com determinadas sequências da molécula de DNA, fornecendo novos recursos para identificar não só determinados microrganismos como comunidades completas com potencial importância na patogénese das doenças periodontais (Wade WG, 2011; Marsh PD, 2011). Existem atualmente várias técnicas baseadas neste princípio e com aplicação no estudo das doenças periodontais como a PCR, *DNA hybridization* e *DNA-DNA checkerboard* (Paster BJ, 2009).

A PCR permite a deteção de microrganismos de forma rápida e sensível em amostras clínicas, sendo especialmente útil em microrganismos de crescimento fastidioso ou de difícil cultura em ambiente laboratorial. O método de PCR assenta em ciclos de aquecimento/arrefecimento que permitem a clivagem da molécula dupla de DNA e a replicação enzimática de determinada porção. Resumidamente, o processo inicia-se com a separação física das duas cadeias da molécula de DNA sujeitas a temperaturas acima dos 90°C (desnaturação do DNA). De seguida, os *primers* (i.e. pequenas sequências de oligonucleotídeos complementares para as extremidades da região alvo da molécula de DNA) emparelham a temperaturas que rondam os 50-60°C (hibridação). E por fim, ocorre extensão dos *primers* por ação enzimática a 70-78°C. Os produtos amplificados são posteriormente analisados por eletroforese e coloração por brometo de etídio.

Vários autores têm utilizado a técnica de PCR no estudo da microbiota periodontal. Tipicamente estes estudos focam-se na identificação de putativos patogénicos periodontais como *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *A. actinomycetemcomitans* (Lotufo RF, 1994; McClellan DL, 1996; Meurman JH, 1997; Lillo A, 2004; Sanz M, 2004). Para situações onde é necessário identificar várias espécies e nas quais a proporção relativa de cada espécie é importante, a técnica de PCR convencional pode não ser o ideal. Nessa sequência, alguns autores têm recorrido à técnica de *PCR real-time* (Lyons SR, 2000; Kawada M, 2004) na qual sondas fluorescentes são adicionadas, permitindo a emissão de um sinal fluorescente durante a amplificação do DNA (Monis PT, 2006), agilizando a obtenção de resultados (Mothershed EA, 2006) e permitindo ultrapassar, de alguma forma, o problema da quantificação (Heid CA, 1996). Porém, esta técnica comunga das limitações da técnica de PCR convencional na análise de múltiplas

amostras polimicrobianas, facto que, levou alguns autores a recorrer à técnica de *PCR multiplex* para identificação simultânea de putativos patogénicos periodontais (Garcia L, 1998; Tran SD, 1999). Nesta abordagem vários conjuntos de *primers*, específicos para diferentes sequências de DNA, são adicionados simultaneamente para permitir a amplificação de uma mistura heterogénea de DNA reduzindo tempo e consumos. Porém, implica a utilização de diferentes *primers* que apresentem a mesma eficácia a determinada temperatura e a produção de *amplicons* (i.e. produtos de amplificação) com diferentes pesos moleculares tornando o processo de otimização lento e complexo (Monis PT, 2006; Paster BJ, 2009).

O recurso a técnicas de *DNA-DNA hybridization* é outra possibilidade no estudo do biofilme periodontal. O método assenta tipicamente na hibridação entre uma sonda (habitualmente marcada com moléculas fluorescentes ou radioativas) e o alvo de DNA. Uma hibridação positiva assinala a presença das espécies alvo (Pereira F, 2008). As sondas de DNA podem ser totais (*whole genomic*) ou sondas de oligonucleotídeos que visam apenas identificar uma zona alvo do DNA de determinada espécie. Apesar de teoricamente serem bastante sensíveis e específicas, podem, na realidade, conduzir a viés de análise. Por exemplo, a utilização de sondas de DNA totais pode, por um lado, favorecer reações cruzadas entre espécies filogeneticamente muito próximas devido à existência de regiões comuns na molécula de DNA, e por outro lado, não detetar todas as estirpes de uma mesma espécie por pequenas variações na sequência de DNA. As sondas de oligonucleotídeos obviam estas limitações, mas são menos sensíveis na deteção de espécies pouco abundantes na amostra. As técnicas de *DNA-DNA hybridization* permitem a identificação simultânea de diferentes espécies, mas em número muito reduzido.

O formato *checkerboard*, pode estender marcadamente o número de amostras avaliadas para uma ampla variedade de espécies bacterianas (Socranski SS, 2005). Existem dois tipos de hibridação *checkerboard*: a direta e a reversa. A técnica de *DNA-DNA checkerboard* direta foi pela primeira vez descrita, em 1994, por Socransky e colaboradores (Socransky SS, 1994b) e desde então tem sido utilizada no estudo da microbiota periodontal (Socransky SS, 1998; Haffajee AD, 2008a e b). É uma técnica que permite a análise quantitativa e simultânea de 40 espécies bacterianas por hibridação do DNA presente numa amostra polimicrobiana com 40 sondas de DNA (*whole genomic*) diferentes marcadas com uma molécula capaz de produzir um sinal mensurável. Devido ao seu desenho característico é possível avaliar até 28 amostras polimicrobianas em simultâneo reduzindo drasticamente o tempo e os custos laboratoriais. Resumidamente, o DNA extraído e desnaturado proveniente das amostras a analisar é fixado de forma individualizada numa única membrana de *nylon*. A hibridação simultânea com as sondas de DNA pré-selecionadas e marcadas permite identificar as espécies presentes nas amostras com um limiar de deteção, tipicamente, de 10^4 células. A quantificação pode ser realizada por comparação direta

de zonas controlo com concentrações conhecidas. (Socransky SS, 1994b). Na técnica de *DNA-DNA checkerboard* reversa, descrita por Paster e colaboradores (Paster BJ, 1998), são utilizadas sondas de oligonucleotídeos de DNA. Para obviar o problema da sensibilidade destas sondas, a sequência alvo de DNA é marcada e amplificada pela técnica de PCR, previamente à hibridação. Esta técnica não permite a quantificação, mas tem a vantagem de, ao contrário da técnica direta, permitir a deteção de bactérias pertencentes ao segmento incultivável (Paster BJ, 2009).

Em 1998, Dibart e colaboradores adaptaram a técnica de *DNA-DNA checkerboard* direta para permitir, de alguma forma, a deteção bacteriana *in situ*, acrescentando novas potencialidades à técnica original. Ao aplicar o gradiente de densidade de Percoll a uma amostra de células epiteliais, previamente ao *DNA-DNA checkerboard*, foi possível separar as células, com ou sem bactérias aderidas, das bactérias livres, e assim calcular a percentagem de determinadas espécies bacterianas no interior ou aderidas à superfície das células epiteliais (Dibart S, 1998).

6.1. Métodos de identificação *in situ* de microrganismos

Após décadas focadas em certos putativos agentes patogénicos e em alguns complexos bacterianos como agentes causadores de periodontite, é atualmente indiscutível que para controlar a interação microbiota-hospedeiro, a benefício do próprio, é necessário compreender a fundo o biofilme supra e subgengival e a sua dinâmica num ecossistema tão característico como o da cavidade oral (Fernandez y Mostajo M, 2011). E, essencialmente, qual o processo disruptor da homeostasia entre a microbiota subgengival e as defesas do hospedeiro. A invasão bacteriana dos tecidos periodontais tem sido apontada como tal. Porém, as dificuldades em visualizar, discriminar, quantificar e determinar a localização de forma exata da flora subgengival e intragengival de forma reprodutível e com boa relação custo-benefício, mantêm a sua caracterização para efeitos de diagnóstico ou investigação, ainda, um desafio (Tribble GD, 2010).

6.1.1. Hibridação *in situ* fluorescente

O método de FISH para deteção bacteriana baseia-se na hibridação entre sondas, habitualmente sondas oligonucleotídicas de DNA marcadas com moléculas fluorescentes, e zonas alvo do rRNA da célula bacteriana, respeitando a integridade celular. Tipicamente são utilizadas as moléculas *cyanine* (p.e., Cy3 e Cy5) e *fluorescein* como marcadores, mas uma nova geração, os Alexa Fluors, têm ganho aceitação pela sua maior fotoestabilidade e luminosidade (Berlier JE, 2003). Contudo, ao fim de algum tempo de permanência do fluorocromo nas células o seu efeito desaparece. Para além de necessitar de equipamentos modernos e dispendiosos (p.e. microscópio com filtros epifluorescentes), as preparações não são permanentes, dependendo do operador a seleção dos campos e o registo das imagens em *software* próprio (Sui W, 2009). Além disso, como os fluorocromos utilizados possuem elevada sobreposição dos seus

espectros de excitação e emissão, a precisão na deteção de determinado fluorocromo só é possível com a utilização de filtros para determinada gama de comprimentos de onda, limitando o número de fluorocromos que podem ser simultaneamente diferenciados. Esta particularidade faz com que o método de FISH convencional apenas permita a visualização de um muito reduzido número de microrganismos diferentes, numa dada amostra. Não obstante, Valm *et al.* (2012) desenvolveram uma estratégia de *Combinatorial Labeling and Spectral Imaging* (CLASI), que por imagem espectral e combinação de dois ou mais fluorocromos em cada microrganismo permite expandir significativamente o número de microrganismos distinguíveis num campo de visão.

O método de FISH (Figura 3) compreende, habitualmente, quatro passos: fixação, hibridação e lavagem seguidos da visualização de resultados por microscopia epifluorescente. A fixação envolve o uso de químicos como a formalina, o paraformaldeído, o metanol ou o etanol que fixam e permeabilizam a célula alvo. Por vezes, um pré-tratamento com lisozima ou outras enzimas proteolíticas pode ser necessário, especialmente para bactérias gram-positivas. Durante a hibridação as sondas entram na célula e procuram hibridar especificamente com a sequência alvo complementar na subunidade 16S do rRNA procariótico. Esta escolha apresenta duas importantes vantagens. A primeira está relacionada com o facto de ser um marcador filogenético muito abundante na célula, o que potencia a intensidade do sinal observado sem necessidade de amplificação prévia. A segunda, deriva do facto de existirem extensas e precisas bases de dados para a subunidade pequena do

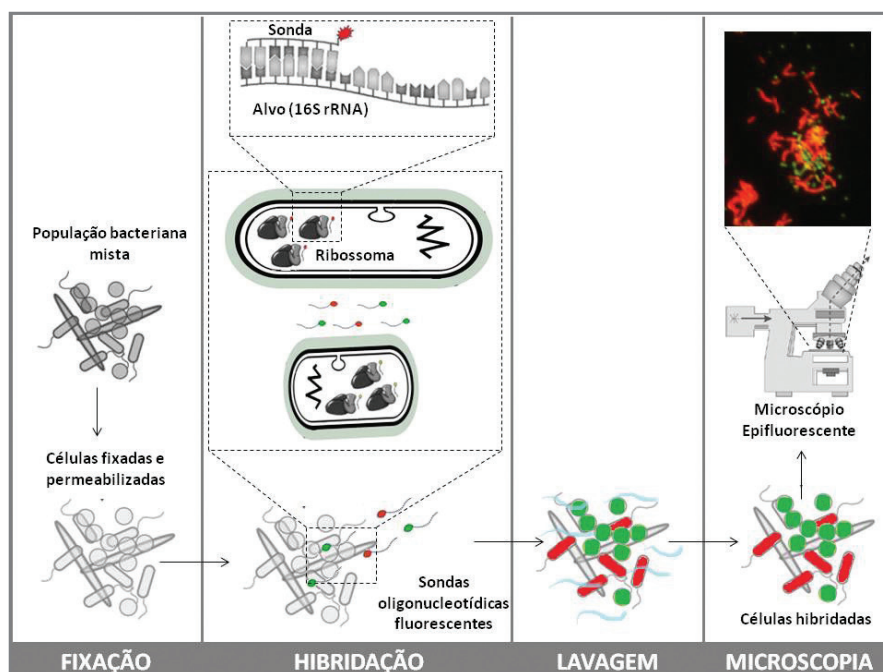


FIGURA 3. Representação esquemática da aplicação do método de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) a uma amostra polimicrobiana. Adaptado de Amann R, 2008.

ribossoma, o que permite um criterioso conhecimento das populações microbianas. A *Ribosomal Database Project* (RDP), por exemplo, possui cerca de 3.224.600 de 16S rRNAs e é atualizada mensalmente (rdp.cme.msu.edu). A hibridação está condicionada por fatores como a temperatura, pH, força iônica e concentração de formamida que são devidamente controlados para garantir que a sonda é capaz de aceder e hibridar com a sequência complementar. Se a sequência alvo não estiver presente nos ribossomas celulares as sondas não são capazes de hibridar e todas as sondas livres são removidas por lavagem. Desta forma, após a otimização do processo, apenas células que contêm a sequência alvo e em condições específicas e controladas retêm a sonda na hibridação e na lavagem, garantindo a especificidade do método (DeLong EF, 1989; Silverman AP, 2007; Wagner M, 2003).

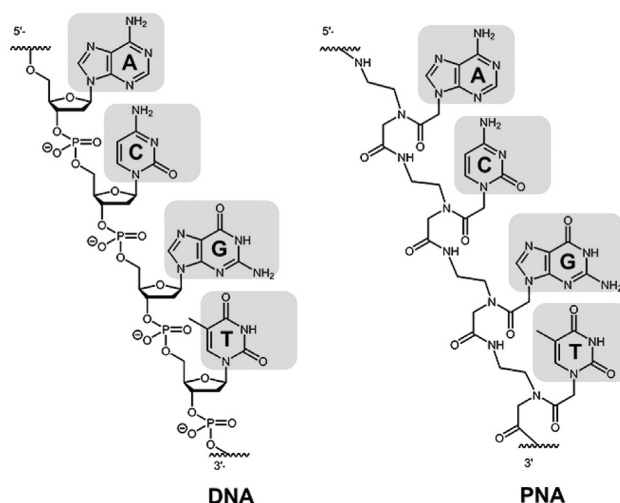


FIGURA 4. Estrutura química das cadeias de DNA e PNA. **A** - adenina, **C** - citosina, **G** - guanina e **T** - timina, \ominus carga negativa. Adaptado de <http://www.biomers.net> (último acesso julho 2015).

Por respeitar a localização e a integridade celular, o método de FISH, é particularmente útil no estudo da organização espacial dos biofilmes. Para além disso, como depende da quantidade de rRNA presente na célula bacteriana a hibridação só é positiva em infecções ativas (Forrest GN, 2007). Como tal, alguns autores têm utilizado esta técnica para observar, *in situ*, a distribuição espacial de patogênicos periodontais no biofilme supra e subgengival (Zijng V, 2010a), bem como, a sua capacidade para invadir as células epiteliais do hospedeiro (Rudney JD, 2001; Colombo AV, 2007). Contudo, apesar do valor acrescentado que oferece no conhecimento da estrutura tridimensional dos biofilmes e sua interação com os tecidos do hospedeiro, esta técnica está fortemente condicionada por algumas limitações no processo de FISH como a baixa permeabilidade celular, afinidade de hibridação e acessibilidade ao local alvo pelas sondas de DNA. Estas limitações causam frequentemente falta de sensibilidade e especificidade com importantes perdas de informação (Amann R, 2008). Para ultrapassar estas limitações têm sido desenvolvidos análogos ou mímicos dos ácidos nucleicos (Cerqueira L, 2008).

7. O ÁCIDO PEPTÍDICO NUCLEICO

O PNA foi publicado pela primeira vez em 1991, por Nielsen e colaboradores (Nielsen PE, 1991) e desde a última metade da década de 90 tem sido utilizado na detecção microbiana (Guimarães N, 2007; Almeida C, 2011; Cerqueira L, 2011; Alves CT, 2014).

Neste mimico de DNA, a cadeia central de desoxirribose-fosfato, carregada negativamente, é substituída por uma cadeia central neutra composta por unidades repetidas de N-(2-aminoetil) glicina unidas por ligações peptídicas. As diferentes bases (purinas e pirimidinas) encontram-se ligadas à cadeia central com uma configuração e distância intramolecular similar ao DNA permitindo o emparelhamento da molécula de PNA com as sequências de DNA ou RNA (Nielsen PE, 1999; Shakeel S, 2006).

A ausência de repulsão negativa entre a cadeia eletricamente neutra de PNA e a cadeia complementar de RNA ou DNA permite uma ligação mais rápida, mas também mais forte e com maior estabilidade térmica que os *duplexes* de DNA/DNA. Regra geral, a temperatura de fusão ou *melting* (T_m) de um duplex PNA/DNA ou PNA/RNA é 1°C superior por cada par de bases (pb) em comparação com o DNA/DNA correspondente. Este aumento na T_m faz com que seja possível o desenho de sondas de PNA mais curtas que as suas homólogas de DNA melhorando, não só o acesso às sequências alvo da molécula de RNA, como a sua especificidade. Uma sonda mais curta é menos tolerante a *mismatches*. De facto, sequências de aproximadamente 15 pb de comprimento são ideais para sondas de PNA, ao contrário das convencionais sequências de 20 a 24 pb das sondas de DNA. Para além disso, a T_m é praticamente independente da concentração salina envolvente possibilitando a hibridação a baixas concentrações. Como resultado, as estruturas secundárias do rRNA ficam destabilizadas melhorando, também por esta via, o acesso às sequências alvo. Isto acontece porque a neutralidade da molécula de PNA ultrapassa a necessidade da presença de iões positivos a contrabalançar a repulsão existente entre duas cadeias negativas. Outra vantagem da molécula de PNA é a sua natureza hidrofóbica que facilita a penetração celular e a difusão através da matriz do biofilme. Por último, e por se tratar de uma molécula sintética apresenta maior resistência às nucleases e proteases celulares (Nielsen PE, 1993; Hyrup B, 1996; Nielsen PE, 1999). O uso de sondas de PNA trouxe robustez e maior sensibilidade e especificidade à técnica convencional de FISH (Cerqueira L, 2008).

7.1. Sondas de PNA

O desenho das sondas de PNA compreende várias etapas e deve obedecer a uma série de condicionalismos por forma a se obter a melhor eficácia possível da técnica de PNA-FISH.

Os oligonucleotídeos potencialmente úteis com cerca de 15 pb podem ser identificados utilizando o programa Primerose acoplado à base de dados de rRNA 16S do RDP-II. Um dos parâmetros mais importantes a ter em consideração na escolha do oligonucleotídeo que servirá de base à sonda de PNA é a sua sensibilidade e especificidade para o microrganismo alvo. A sensibilidade e especificidade teórica podem ser calculadas recorrendo às bases de dados atualizadas disponíveis no RDP-II e no *National Center for Biotechnology* (NCBI). A sensibilidade corresponde ao quociente entre o número de estirpes alvo detetadas pela sonda e o número total de estirpes alvo que estão documentadas na base de dados, enquanto a especificidade é o quociente entre o número de estirpes não-alvo não detetadas pela sonda e o número total de estirpes não-alvo que estão documentadas na base de dados (Almeida C, 2010). O segundo parâmetro muito importante a considerar é a inexistência de autocomplementaridade na sequência escolhida, uma vez que a hibridação entre sequências complementares de PNA pode ocorrer gerando falsos positivos (Stender H, 2002). Em terceiro lugar, devem ser preferidas sequências com elevada percentagem de guanina e citosina, e preferencialmente, com uma destas bases em posição inicial e final, por serem bases com ligações mais fortes favorecendo uma hibridação mais específica. Finalmente, a variação global da energia livre de Gibbs acima do limite teórico de -13.0 kcal/mol, definido para sondas de DNA deverá também ser ambicionado no desenho das sondas de PNA, por forma a maximizar a afinidade, i.e., a capacidade que a sonda tem de se ligar ao seu alvo segundo as condições de hibridação. (Yilmaz LS, 2006; Silverman AP, 2007). A energia livre de Gibbs que envolve as interações entre rRNA e a sonda de PNA pode ser estimada pelas equações de Santalucia *et al.* (SantaLucia J Jr, 2004).

3.

INVESTIGAÇÃO

| ESTRUTURA DO CAPÍTULO

Este capítulo apresenta separadamente os três estudos conduzidos ao longo deste programa doutoral e que visam corresponder, respetivamente, aos três grandes objetivos propostos.

O primeiro estudo é um ensaio clínico randomizado, *crossover* e duplamente cego que visou avaliar o impacto da disrupção mecânica e da ação química de colutórios orais sobre o biofilme oral na redução de CSV. O segundo estudo é uma revisão sistemática elaborada com o objetivo de tentar estabelecer a evidência científica existente acerca da relação entre a invasão do periodonto por patogénicos periodontais e doença periodontal. O terceiro estudo reporta o desenvolvimento e aplicação de novas sondas de PNA para a deteção de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* em amostras clínicas.

E1

EFEITO COMPARATIVO DE UM NOVO COLUTÓRIO CONTENDO CLOROHEXIDINA, TRICLOSAN E ZINCO NA REDUÇÃO DE COMPOSTOS SULFURADOS VOLÁTEIS: UM ESTUDO RANDOMIZADO, Crossover E DUPLAMENTE CEGO.

Mendes L, Coimbra J, Pereira AL, Resende M, Pinto MG

Departamento de Periodontologia, Faculdade de Medicina Dentária, Universidade do Porto, Portugal.

Objetivos: Este estudo tem como objetivos a comparação do efeito redutor nos níveis de CSV de dois colutórios orais, utilizando um modelo de mau hálito matinal, e a avaliação do papel do controlo mecânico da placa bacteriana (CMP) quando realizado previamente ao bochecho com o colutório.

Material e Métodos: Onze voluntários com boa saúde oral foram incluídos num estudo randomizado, duplamente cego e com um desenho *crossover* composto por seis etapas e um período de *washout* de 7 dias. Dois colutórios comerciais foram testados usando uma solução salina (NaCl 0,9%) como controlo negativo: um colutório continha 0,05% de clorohexidina, 0,05% de cloreto de cetilpiridínio e 0,14% de lactato de zinco (CHX-CPC-Zn), enquanto o outro continha 0,05% de clorohexidina, 0,15% de triclosan e 0,18% pidolato de zinco (CHX-triclosan-Zn). O monitor de CSV portátil (Halimeter®) foi usado para a quantificação de CSV. As avaliações foram feitas no início do estudo (*baseline*) e 1, 3 e 5 horas após o bochecho. Diferenças significativas foram detetadas por análise de variância.

Resultados: Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos na *baseline*. Este estudo não foi capaz de demonstrar uma influência significativa do CMP na redução dos níveis de CSV quando realizado antes do bochecho com os colutórios ($p = 0,631$). Não obstante, observou-se que ambos os colutórios reduziram efetivamente os níveis de CSV em todos os intervalos de teste ($p < 0,05$). Porém, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os colutórios em nenhum dos intervalos de teste ($p = 0,629$, $p = 0,069$ e $p = 0,598$ em 1, 3 e 5 horas).

Conclusão: Este estudo demonstrou que CHX-CPC-Zn e CHX-triclosan-Zn têm efeitos significativos e similares na redução dos níveis de CSV, que persistem por pelo menos 5 horas. Tais efeitos foram independentes da CMP prévio, que não conseguiu melhorar os resultados do uso isolado de colutórios orais.

Os resultados deste estudo encontram-se publicados no artigo: **Mendes L, Coimbra J, Pereira AL, Resende M, Pinto MG.** Comparative effect of a new mouthrinse containing chlorhexidine, triclosan and zinc on volatile sulphur compounds: a randomized, crossover, double-blind study. *Int J Dent Hygiene* 2015. DOI: 10.1111/idh.12132 [Epub ahead of print]

MATERIAL E MÉTODOS

Voluntários

Os alunos da Faculdade de Medicina Dentária do Porto foram convidados a participar. Antes do início do estudo, os voluntários foram submetidos a uma consulta de triagem. Os indivíduos que concordaram em cumprir com as seguintes instruções foram incluídos:

- a) abster-se da utilização de colutórios orais com ação antisséptica uma semana antes e durante o estudo;
- b) abster-se do consumo de alho, cebola, alimentos picantes e bebidas alcoólicas 24 horas antes dos períodos experimentais;
- c) não utilizar produtos cosméticos perfumados nos períodos experimentais;
- d) abster-se da ingestão de alimentos sólidos e líquidos (exceto água) durante períodos experimentais;
- e) abster-se do consumo de gomas de mascar ou doces durante os períodos experimentais; e,
- f) não executar quaisquer métodos de higiene oral antes e durante os períodos experimentais.

Os indivíduos que apresentavam qualquer uma das seguintes condições foram excluídos:

- a) lesões de cárie cavitadas;
- b) lesões na mucosa oral;
- c) presença de mais do que uma bolsa periodontal ≥ 5 mm;
- d) índice de HPS $\geq 10\%$;
- e) patologia sistémica;
- f) terapia antimicrobiana recente (≤ 3 meses) ou atual; e,
- g) gravidez ou lactação.

O consentimento informado, por escrito, foi obtido junto de todos os voluntários. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Dentária do Porto.

O desenho do estudo

Este é um estudo *crossover*, randomizado e duplamente cego. Seguindo uma sequência aleatória gerada por computador, os voluntários utilizaram tanto os colutórios como o controlo negativo, com ou sem remoção mecânica de placa bacteriana prévia, em 6 períodos experimentais distintos, de 5 horas cada, originando 6 grupos *crossover* (E1-

Figura 1). Cada período experimental foi seguido de um período de 7 dias de *washout*. À exceção dos períodos experimentais, não foi pedido aos voluntários que alterassem o seu regime normal de higiene oral durante o período de estudo de 6 semanas. Para induzir mau hálito matinal os voluntários abstiveram-se de qualquer medida higiene oral, de comer, de beber, e de mascar gomas ou doces após a meia-noite da noite anterior aos períodos experimentais.

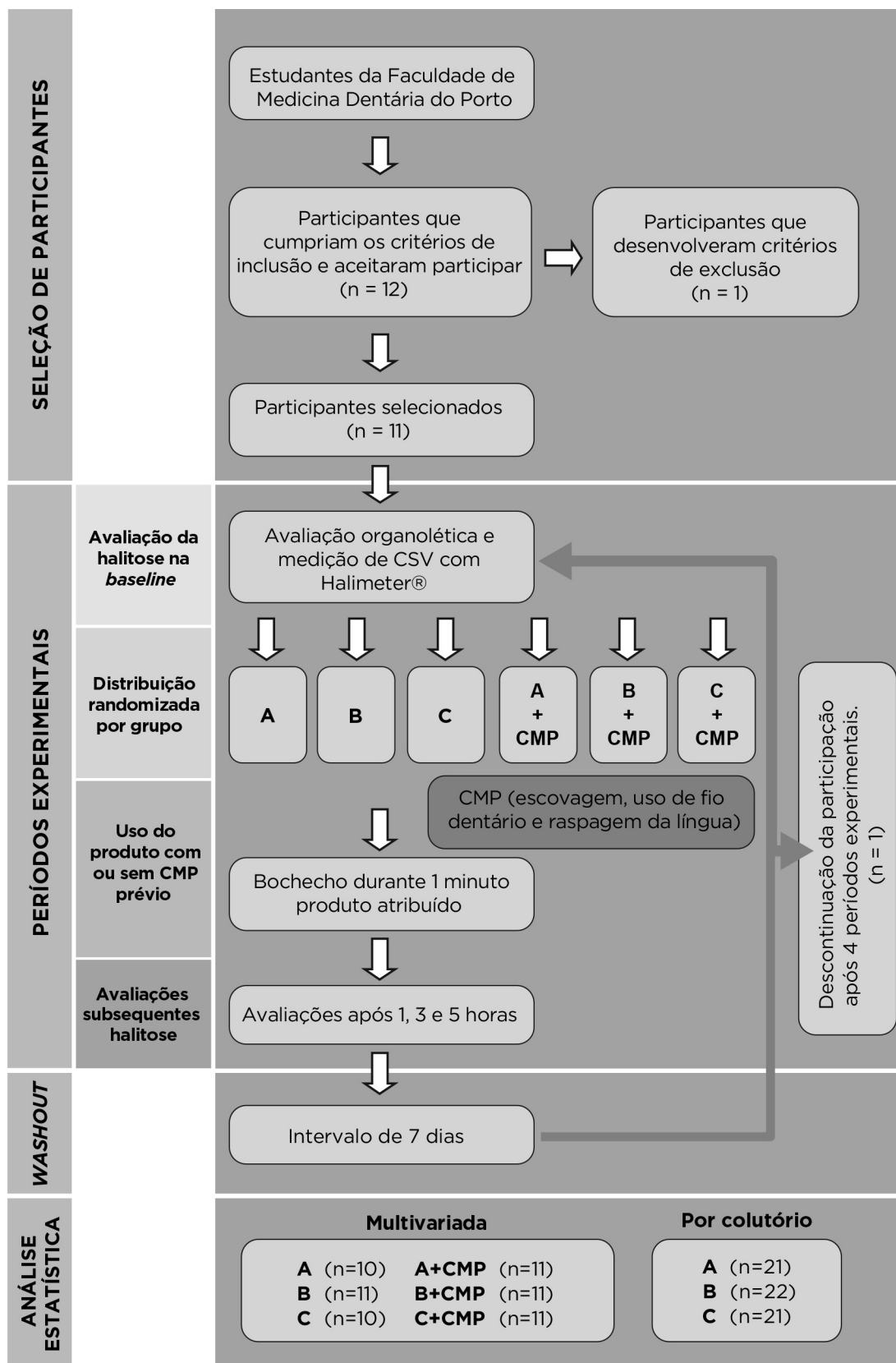
Os produtos de teste Halita® (Dentaid, Cerdanyola, Barcelona, Espanha) (CHX-CPC-Zn) e Bexident® Halitosis (ISDIN, Barcelona, Espanha) (CHX-triclosan-Zn) bem como o controlo negativo (NaCl 0,9%) foram comprados numa farmácia local e, de seguida, reembalados em garrafas opacas, idênticas e codificadas como A, B e C, por um agente externo, garantindo a ocultação no estudo. Nem os participantes nem os examinadores estavam cientes da codificação, uma vez que esta foi mantida num envelope opaco e lacrado e só foi revelada após a análise estatística estar completa.

Período experimental

O estudo foi realizado na clínica da Faculdade de Medicina Dentária do Porto. Cada período experimental começou com uma avaliação basal do mau hálito que incluiu a avaliação organolética do ar exalado pela cavidade oral e a medição de CSV utilizando um monitor portátil de CSV, o Halimeter® (Interscan Corporation, Chatsworth, CA, EUA). De seguida, foi pedido aos voluntários para bochecharem (sem gargarejar) com o produto atribuído durante 1 minuto e sob supervisão. Para alguns grupos (CMP), o bochecho foi precedido por remoção mecânica da placa bacteriana, realizada por um profissional treinado, que incluiu escovagem com uma escova de *nylon*, montada em contra-ângulo, e água, uso de um fio dentário *standard*, e raspagem da língua com uma espátula de madeira. As avaliações do mau hálito foram repetidas 1, 3 e 5 horas após o bochecho.

Avaliação da halitose

O ar exalado pela cavidade oral foi avaliado organoleticamente utilizando uma escala de 0-5 (Rosenberg M, 1991), após 1 minuto com a boca fechada, por 2 examinadores treinados localizados a uma distância de 10 centímetros da boca do voluntário. Após 1 minuto adicional com a boca fechada, foi colocada uma palhinha descartável sobre a superfície dorsal da língua tendo-se realizado 2 medições consecutivas de CSV, utilizando o Halimeter® (Interscan Corporation, Chatsworth, CA, EUA). Os níveis de CSV foram registados em partes por bilião (ppb), tendo-se utilizado a média das duas medições na análise dos dados.



E1 | FIGURA 1. Fluxograma do recrutamento de voluntários e desenho do estudo.

Análise estatística

A estimativa do tamanho da amostra foi feita utilizando o *software G*power v3.1.7* (Faul F, 2007). Para avaliar o efeito e possível interação dos colutórios e CMP na redução dos níveis de CSV foi realizada uma análise de variância multivariada (MANOVA). As diferenças entre os grupos foram avaliadas com teste de Kruskal-Wallis seguido de comparações *pairwise* utilizando o teste Mann-Whitney U com correção de Bonferroni. As diferenças dentro dos grupos de tratamento foram avaliadas pelo teste de Friedman, seguido dos testes de *post-hoc* LSD. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado como uma medida do tamanho do efeito. A correlação de Spearman foi efetuada para determinar a relação entre as pontuações organolépticas e as medições CSV. Foi considerado um nível de significância de $\alpha = 0,05$. Todos os dados foram analisados utilizando o *software* estatístico PASW® 18 (SPSS Inc., Chicago).

RESULTADOS

Onze indivíduos, 8 do sexo feminino (72,7%) e 3 do sexo masculino (27,3%), com idades entre os 20 e 23 anos (média \pm DP: 21,9 \pm 0,8) foram incluídos (E1-Tabela 1).

E1 | TABELA 1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE VOLUNTÁRIOS

Características dos participantes (n=11)	
Género, n (%)	
Masculino	3 (27,3)
Feminino	8 (72,7)
Idade, média (\pm DP)	21,9 (\pm 0,8)
Níveis de CSV, média (\pm DP)	209,8 (\pm 109)
Pontuação organoléptica, mediana (AIQ [25 ^o -75 ^o])	1 (0-2)
Hemorragia após sondagem (%), índice, média (\pm DP)	5,8 (\pm 2,8)
Profundidade de sondagem (%)	
<3 mm	100
>3 e <5	0

CSV: Compostos sulfurados voláteis; DP: Desvio padrão; AIQ: amplitude interquartis;

Dez indivíduos (90,9%) completaram todos os 6 períodos experimentais consecutivos. Um indivíduo (9,1%) necessitou de tratamento antibiótico urgente, por um problema médico não relacionado, e só completou os 4 primeiros períodos experimentais. Os valores médios dos níveis de CSV para todos os grupos e em todos os intervalos de teste estão expressos na E1-Tabela 2.

A análise multivariada

A análise estatística multivariada *per protocol* revelou que o efeito observado sobre os níveis de CSV pode ser atribuído apenas à utilização de colutórios ($p = 0,001$), uma vez que o CMP não influenciou significativamente os valores de CSV ($p = 0,631$), mesmo quando executado antes da realização do bochecho ($p = 0,959$).

Como o efeito CMP foi considerado insignificante, a análise estatística prosseguiu considerando apenas os grupos definidos pelo uso do colutório (controlo negativo, CHX-triclosan-Zn e CHX-CPC-Zn).

Impacto dos colutórios no mau hálito matinal

O mau hálito matinal foi avaliado por medição dos CSV e por avaliação organolética. Foi encontrada uma correlação positiva e significativa entre os dois métodos, em todos os intervalos de teste: basal ($r_s = 0,38$; $p = 0,001$), 1h ($r_s = 0,43$; $p = 0,001$), 3h ($r_s = 0,48$; $p < 0,01$) e 5h ($r_s = 0,54$; $p < 0,001$).

Níveis de CSV e avaliação organolética na baseline

Os níveis CSV (média \pm DP: $209,8 \pm 109$) e as pontuações organoléticas (AIQ [25° - 75°]: 0-2) foram relativamente baixos, o que está de acordo com o modelo de mau hálito matinal (E1-Tabela 1). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de CSV ($p = 0,982$) (E1-Tabela 3) e nas pontuações organoléticas ($p = 0,513$) (E1-Tabela 4) entre os grupos teste. O período de 7 dias de *washout* parece ser adequado uma vez que nenhum efeito *carry-over* parece ter ocorrido.

Análise intragrupo por colutório

A análise estatística demonstrou que os colutórios CHX-triclosan-Zn e CHX-CPC-Zn reduziram significativamente os níveis de CSV na primeira hora após a utilização ($p = 0,002$ e $p < 0,001$, respetivamente). Esta redução manteve-se durante todo o período experimental de 5 horas, sem se encontrarem diferenças significativas dentro de grupos de tratamento, nos diferentes intervalos (E1-Tabela 3).

Estas observações contrastam com as observadas no grupo do controlo negativo, onde foi observado um aumento progressivo dos níveis de CSV durante todo o período experimental de 5 horas.

E1 | TABELA 2. NÍVEIS DE CSV (PPB) NA BASELINE, 1H, 3H, 5H (MÉDIA±DP) POR GRUPO

Colútorio	CMP	n	CSV <i>baseline</i>	CSV 1h	CSV 3h	CSV 5h
Controlo	Sim	11	239 (±138,7) ^a	258 (±154,9) ^{a,†}	292 (±210,1) ^{a,*,§}	298 (±208,3) ^{a,†,*,§}
	Não	10	176 (±62,7) ^a	225 (±111,8) ^{a,†}	252 (±110,8) ^{a,†,‡,£}	262 (±115,1) ^{a,£,¶,¶,£,□}
CHX-triclosan-Zn	Sim	11	241 (±130,4) ^a	174 (±137,4) ^a	191 (±135,9) ^a	188 (±178,5) ^{a,†,£}
	Não	11	197 (±119,0) ^a	143 (±63,1) ^a	148 (±69,9) ^{a,†}	134 (±49,3) ^{a,†,¶}
CHX-CPC-Zn	Sim	11	210 (±111,1) ^a	161 (±127,6) ^{a,†,‡}	164 (±147,2) ^{a,£,*}	134 (±76,8) ^{a,*,£}
	Não	10	193 (±69,3) ^a	148 (±52,8) ^a	140 (±62,7) ^{a,†,§}	147 (±73,5) ^{a,§,□}

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas em colunas pertencentes ao mesmo grupo diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Médias seguidas dos mesmos símbolos (1, 1*, E, S, II, q, q) em colunas diferem estatisticamente ($p < 0,05$). CSV: Compostos sulfúridos voláteis; CMP: Controle mecânico de placa bacteriana; DP: desvio padrão; CHX: clorhexidina; CPC: cloreto de cetilpiridínio; Zn: zinco.

Análise entre grupos por colutório

Ambos os colutórios CHX-triclosan-Zn e CHX-CPC-Zn mostraram uma redução significativa nos níveis de CSV quando comparados com o controlo negativo às 1h ($p = 0,013$; $r = -0,41$ e $p = 0,009$; $r = -0,42$), 3h ($p = 0,010$; $r = -0,42$ e $p < 0,001$; $r = -0,59$) e 5h ($p < 0,001$; $r = -0,64$ e $p < 0,001$; $r = -0,64$), após o bochecho.

Embora os colutórios tenham exibido um comportamento diferente, com CHX-triclosan-Zn a alcançar a redução de CSV máxima (27,5%) na primeira hora de tratamento e CHX-CPC-Zn a atingir o seu máximo de redução de CSV (30,1%) 5 horas após o bochecho, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os colutórios em nenhum dos intervalos de teste ($p = 0,781$; $r = -0,05$; $p = 0,068$; $r = -0,3$ e $p = 0,781$; $r = -0,05$ em 1, 3 e 5 horas).

E1 | TABELA 3. NÍVEIS DE CSV (PPB) NA *BASELINE*, 1H, 3H, 5H (MÉDIA±DP) POR GRUPO E PERCENTAGEM MÁXIMA DE ALTERAÇÃO (%C CSV) POR COLUTÓRIO

Grupo	n	CSV <i>baseline</i>	CSV 1h	CSV 3h	CSV 5h	% C CSV
Controlo	21	208,0 ± 111,5 ^{a,A}	241,5 ± 133,8 ^{a,A}	275,7 ± 167,0 ^{a,A}	280,1 ± 167,3 ^{a,A}	34,7 ^a
CHX-triclosan-Zn	22	219,8 ± 123,6 ^{a,A}	159,3 ± 105,3 ^{b,B}	169,7 ± 107,5 ^{b,B}	161,3 ± 130,3 ^{b,B}	- 27,5 ^b
CHX-CPC-Zn	21	201,6 ± 91,7 ^{a,A}	155,25 ± 97,2 ^{b,B}	152,5 ± 112,9 ^{b,B}	141,0 ± 73,7 ^{b,B}	- 30,1 ^b

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas em colunas diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas em linhas diferem estatisticamente ($p < 0,05$). CSV: Compostos sulfurados voláteis; % C CSV: percentagem máxima de alteração nos CSV; DP: desvio padrão; CHX: clorohexidina; CPC: cloreto de cetilpiridínio; Zn: zinco.

E1 | TABELA 4. PONTUAÇÃO ORGANOLÉTICA NA *BASELINE*, 1H, 3H, 5H (MEDIANA [AIQ (25º-75º PERCENTIL)]) POR COLUTÓRIO

Grupo	n	ORG <i>baseline</i>	ORG 1h	ORG 3h	ORG 5h
Controlo	21	1 (0-2) ^{a,A}	1 (0-2) ^{a,A}	1 (0-2) ^{a,A}	1 (0-2) ^{a,A}
CHX-triclosan-Zn	22	1 (0,75-2) ^{a,A}	0 (0-0,25) ^{b,B}	0 (0-1) ^{a,B}	0 (0-1,25) ^{b,B}
CHX-CPC-Zn	21	1 (0-2) ^{a,A}	0 (0-1) ^{a,B}	0 (0-1) ^{a,B}	0 (0-1,25) ^{b,B}

Medianas seguidas de diferentes letras minúsculas em colunas diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Medianas seguidas de diferentes letras maiúsculas em linhas diferem estatisticamente ($p < 0,05$). ORG: pontuação organolética; CHX: clorohexidina; CPC: cloreto de cetilpiridínio; Zn: zinco. AIQ: amplitude interquartis.

Com base nestes resultados, é razoável afirmar que o tamanho da amostra foi suficiente para detetar efeitos de média e grande dimensão (Cohen J, 1992). No entanto, não podemos excluir totalmente que diferenças entre efeitos de menor dimensão entre o CHX-triclosan-Zn e CHX-CPC-Zn poderiam alcançar significância estatística com um tamanho maior de amostra.

DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, numerosos colutórios foram comercializados alegando eficácia no controlo do mau hálito. Estudos anteriores demonstraram que a associação de CHX (em dose baixa), CPC e Zn teve um efeito anti-halitose significativo e duradouro (Winkel EG, 2003; Roldán S, 2004; Fedorowicz Z, 2008; Blom T, 2012).

Neste estudo, pretendeu-se comparar esta formulação de sucesso com uma fórmula semelhante composta por baixa dosagem CHX, triclosan e Zn. Além disso, procurou-se avaliar se a realização de CMP antes do colutório poderia potenciar a redução de CSV.

Os dois colutórios tiveram um efeito significativo e sobreponível na redução dos níveis de CSV, quando comparados com o controlo negativo, tanto nos grupos CMP como nos grupos não-CMP. O CMP não conseguiu demonstrar uma influência significativa na redução dos níveis de CSV quando realizado antes do colutório. Estes dados sugerem que os efeitos observados poderão ser atribuídos exclusivamente à utilização do colutório, uma vez que, a escovagem dentária, o uso do fio dentário e a raspagem da língua, *per se*, tiveram baixo impacto sobre a redução do mau hálito matinal. Estes resultados contrastam com os de outros autores que encontraram uma redução significativa nos CSV com procedimentos de higiene oral, particularmente com a raspagem da língua (Farrell S, 2006; Faveri M, 2006).

O modelo de mau hálito matinal, apesar de bem aceite para demonstrar a redução de CSV por colutórios, pode não ser o mais adequado para avaliar o impacto do CMP na redução de CSV. Acredita-se que o mau hálito matinal resulta da xerostomia e da menor disponibilidade de oxigénio durante a noite, o que promove a formação transitória de CSV por bactérias anaeróbias (Kleinberg I, 2002). A ausência de um biofilme gram-negativo estruturado, maduro e predominantemente anaeróbio (apenas 8 a 12 horas de abstenção de higiene oral) pode ter levado a uma subestimação do efeito da remoção mecânica da placa bacteriana. No entanto, Quirynen *et al.* (2005), também não conseguiu encontrar uma redução significativa nos níveis de CSV após tratamento periodontal seguido de duas semanas de higiene oral realizada pelos próprios pacientes, diagnosticados com periodontite moderada, exceto quando um colutório foi adicionado.

O nosso estudo suporta dados anteriormente publicados alegando a eficiência de CHX-CPC-Zn no controlo do mau hálito e demonstra que a associação de baixa dose de CHX, triclosan e Zn teve um efeito anti-CSV similar.

A eficácia destes dois colutórios na redução dos níveis de CSV pode ser explicada pela combinação da ação antibacteriana com o efeito neutralizador de odor exibido pelos componentes das soluções. A CHX é um agente anti-halitose bem aceite e é considerado o *gold standard* no controlo químico da halitose. A eficácia antimicrobiana de CHX é dose e tempo-dependente (Quirynen M, 2002; Young A, 2003). Doses mais altas têm um efeito antimicrobiano superior, mas podem causar manchas nos dentes e alteração do paladar, após longos períodos de uso, que são muitas vezes necessários no tratamento da halitose. Em ambos os colutórios testados, a concentração de CHX é reduzida para ultrapassar estes efeitos adversos, sendo a ação antibacteriana complementada com outros agentes, tais como o triclosan e o CPC (Moran J, 1997; Roldán S, 2003; Sreenivasan PK, 2005). O CPC tem um efeito limitado na redução dos níveis de CSV quando utilizado isoladamente (Kleinberg I, 2002; Carvalho MD, 2004; Saad S, 2011). No entanto, vários estudos têm mostrado que o CPC tem um efeito sinérgico quando utilizado conjuntamente com a CHX, conseguindo uma redução superior dos CSV do que a CHX isolada (Quirynen M, 2002; Roldán S, 2004). O triclosan, quando utilizado como agente único, tem mostrado resultados positivos nomeadamente quando aplicado em dentífricos, embora, de forma semelhante ao CPC, o seu efeito na redução dos níveis de CSV seja inferior ao da CHX (Niles HP, 1999; Sharma NC, 1999; Nogueira-Filho GR, 2002). Ambos os colutórios contêm Zn. Contrastando com os componentes anteriores, o uso de Zn no controlo da halitose assenta essencialmente no seu efeito neutralizador. O Zn reage com os CSV formando um complexo insolúvel não-volátil e, portanto, não-aromático, (ZnS) (Boulware RT, 1984) de uma forma dose-dependente, em particular depois da primeira hora após o bochecho (Rösing CK, 2002; Kleinberg I, 2002).

O efeito na redução de CSV dos colutórios anti-halitose após uma única utilização em indivíduos com mau hálito matinal apresenta boa relação custo-benefício, implicações éticas mínimas e tem sido aceite na literatura em estudos preliminares e comparativos da eficácia de produtos (Roldán S, 2004).

Os nossos resultados suportam o uso da associação CHX-triclosan-Zn no controlo da halitose, mas a extrapolação dos resultados para os pacientes com halitose genuína deve ser feita com cuidado. Para determinar se o efeito anti-CSV observado irá traduzir uma melhoria clínica em pacientes com halitose, sem efeitos adversos indesejáveis, são necessários estudos de longo prazo, tal como recomendado pela *American Dental Association* nas suas orientações para aprovação de produtos anti-halitose. Além disso, falta clarificar definitivamente a importância da disrupção mecânica da placa bacteriana no controlo do mau hálito.

CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que os colutórios CHX-CPC-Zn e CHX-triclosan-Zn têm efeitos significativos e similares na redução dos níveis de CSV, que persistem por pelo menos 5 horas em indivíduos adultos saudáveis com mau hálito matinal. Tais efeitos foram independentes do CMP prévio, que não conseguiu melhorar os resultados da utilização do uso do colutório isoladamente.

Mendes L ¹, Azevedo NF ², Felino A ³, Pinto MG ¹

¹ Departamento de Periodontologia, Faculdade de Medicina Dentária, Universidade do Porto, Portugal.

² LEPABE – *Laboratory for Process Engineering, Environment, Biotechnology and Energy*, Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Portugal.

³ Departamento de Cirurgia Oral, Faculdade de Medicina Dentária, Universidade do Porto, Portugal.

Introdução: A invasão bacteriana dos tecidos periodontais tem sido apontada como um passo relevante na etiopatogenia da doença periodontal. A presente revisão sistemática avaliou a evidência científica existente sobre a relação entre a qualidade ou quantidade da microbiota periodontal nos tecidos periodontais e o desenvolvimento de doença periodontal.

Métodos: Foram revistas as bases de dados Medline, PubMed, Cochrane-central, ISI Web of Knowledge e SCOPUS, até janeiro de 2014. Foram selecionados todos os estudos que reportaram a avaliação de invasão de patogénicos periodontais em tecidos humanos.

Resultados: Foram encontrados 440 títulos/resumos dos quais 26 foram selecionados para leitura completa. Vinte e três artigos foram posteriormente excluídos devido à existência de dados insuficientes ou de um protocolo de estudo não relacionado com os objetivos desta revisão sistemática. Todos os estudos incluídos foram estudos de caso-controlo que avaliaram a presença de bactérias intracelulares ou aderentes às células epiteliais em bolsas periodontais *versus* sulcos gengivais. Os protocolos de estudo apresentaram heterogeneidade quanto às definições de caso e controlo, bem como nas abordagens metodológicas empregues na identificação microbiana. Não foram encontradas diferenças significativas consistentes relacionadas com a presença/ausência ou proporção de periopatógenos específicos, uma vez que, apenas um estudo encontrou diferenças estatisticamente significativas em relação à presença de *A. actinomycetemcomitans* ($p = 0,043$), *T. forsythia* ($p < 0,001$), *P. intermédia* ($p < 0,001$), *C. ochracea* ($p < 0,001$) e *C. rectus* ($p = 0,003$) em células epiteliais de bolsas periodontais *versus* sulcos gengivais. Todos os estudos relataram uma maior carga bacteriana inespecífica no interior ou aderente a células epiteliais colhidas em bolsas periodontais em comparação com sulcos gengivais.

Conclusão: Os dados atualmente disponíveis apresentam qualidade baixa a moderada e são inconsistentes em razão do desenho dos estudos, descrições incompletas e diversidade metodológica. Assim sendo, não existe evidência científica suficiente para suportar ou excluir a invasão de patogénicos periodontais como um passo chave na etiopatogénese da doença periodontal, sendo necessários mais estudos.

Os resultados deste estudo encontram-se publicados no artigo: **Mendes L, Azevedo NF, Pinto MG.** Relationship between invasion of the *periodontium* by periodontal pathogens and periodontal disease: a systematic review. *Virulence* 2015; 6(3):208-215, DOI: 10.4161/21505594.2014.984566

MÉTODOS

Esta revisão sistemática foi conduzida de acordo com as *guidelines* da *Cochrane Collaboration* (Higgins JPT, 2013) e *Transparent Reporting of Systematic Reviews and Meta-Analyses [PRISMA statement]* (Moher D, 2009), por forma a responder à seguinte questão: Qual a relação entre a qualidade ou quantidade de putativos patogénicos periodontais nos tecidos periodontais e a doença periodontal?

CrITÉrios de elegibilidade

Todos os estudos que reportaram a avaliação da invasão de patogénicos periodontais em tecidos periodontais humanos foram considerados elegíveis. Para ser o mais abrangente possível não foram aplicadas restrições em relação ao ano ou língua da publicação. A decisão de exclusão de artigos de língua estrangeira que não a inglesa foi adiada para a próxima etapa. Os artigos de revisão e os casos clínicos foram excluídos.

Estratégia de pesquisa

Quatro bases de dados *online* foram utilizadas na procura de artigos que cumpriam adequadamente os objetivos do estudo: a *National Library of Medicine*, Washington D.C. (MEDLINE-PubMed), a *Cochrane Central Register of Controlled Trials* (CENTRAL), a *ISI Web of Knowledge* (Thomson Reuters) e a *SCOPUS* (Elsevier). A pesquisa decorreu até 22 de janeiro de 2014 e seguiu uma estratégia de busca estruturada que foi desenvolvida por forma a incluir qualquer artigo publicado que investigasse a invasão de patogénicos periodontais em indivíduos com doença periodontal. A seguinte estratégia foi utilizada na pesquisa: (((*periodontitis* OR “*periodontal disease*” OR “*periodontal pocket*”) AND (*identification* OR *detection* OR *localization*) AND *bacteria**) AND *invas** OR *intracellular* OR *tissue** OR “*epithelial cells*”). As palavras-chave foram combinadas com operadores booleanos e o símbolo asterisco (*) foi utilizado para truncar palavras. A estratégia de busca foi adaptada à base de dados utilizada.

Triagem e seleção

Primeiro, dois revisores independentes (LM e MP) avaliaram os títulos e resumos dos artigos encontrados na procura de trabalhos elegíveis. Em segundo lugar, foram obtidos os textos completos desses artigos e analisados em relação à finalidade do estudo, protocolo e dados reportados. A pesquisa foi posteriormente complementada com uma pesquisa manual ao longo da bibliografia dos estudos selecionados na tentativa de encontrar mais artigos que pudessem satisfazer os critérios de elegibilidade.

Extração e análise de dados

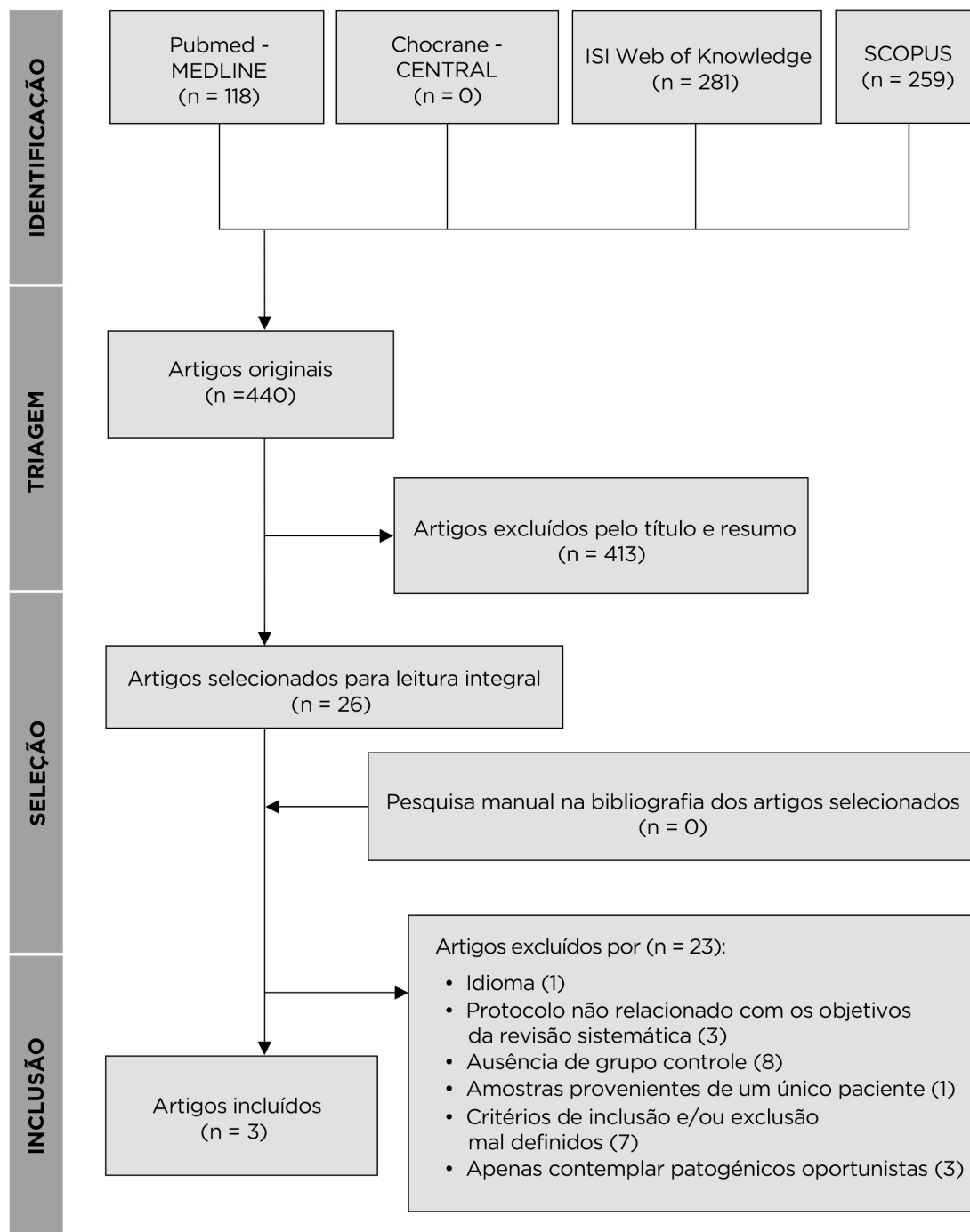
Os dados dos artigos que atenderam aos critérios de seleção foram processados para análise. Informações sobre o ano de publicação, desenho do estudo, população, critérios de inclusão e exclusão, definições de caso e controlo, características dos participantes, tipo de intervenção, apuração da exposição, amostra de células, microrganismos encontrados e sua localização e análise estatística foram recolhidos por LM e MP, usando folhas de extração de dados.

Heterogeneidade

A heterogeneidade entre os estudos foi detalhada de acordo com os seguintes fatores: características da população, desenho do estudo, definição de caso e de controlo, metodologia utilizada e tipo de patogénicos encontrados.

Avaliação da qualidade

A qualidade metodológica dos estudos selecionados foi pontuada de forma independente por dois revisores (LM e MP). Qualquer discordância foi resolvida após discussão adicional. Como todos os artigos selecionados eram estudos não aleatórios (estudos de caso-controlo) a qualidade metodológica foi avaliada combinando vários critérios propostos no STROBE *statement* (von Elm E, 2007), Newcastle – Ottawa *quality assessment scale* (Wells GA, 2011), Downs and Black *checklist for non-randomized studies* (Downs SH, 1998) and SIGN50 *guidelines* (Scottish Intercollegiate Guidelines Network, 2004), tal como sugerido pela *Quality Assessment Tools Project Report* elaborada pela *Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health* (Bai A, 2012). Resumidamente, um estudo foi classificado como de alta qualidade, com um baixo risco de confusão ou viés e com uma alta probabilidade de relação causal (++), quando todos os seguintes critérios foram considerados e descritos de forma adequada: pergunta apropriada e claramente focada, critérios de exclusão definidos, critérios de seleção dos casos, critérios de seleção dos controlos, representatividade dos casos, comparabilidade de casos e controlos, apuração da exposição, ocultação, fonte de financiamento e análise estatística. Quando alguns dos critérios não foram cumpridos ou não foram adequadamente descritos, mas é improvável que esse facto altere as conclusões obtidas, o estudo foi classificado como bem conduzido, com baixo risco de confusão ou viés e com moderada probabilidade de relação causal (+). Quando alguns dos critérios não foram cumpridos ou não foram descritos adequadamente e é provável que esse facto altere as conclusões obtidas, o estudo foi classificado como estudo com um alto risco de confusão ou viés e com um risco significativo de relação não causal (-).



E2 | FIGURA 1. Fluxograma da pesquisa bibliográfica e seleção dos estudos.

E2 | TABELA 1. CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS INCLUIDOS NA REVISÃO SISTEMÁTICA

A. Características dos participantes						
#	Desenho do estudo	n	População	Masculino/feminino % (Idade±DP)	Fumadores (%)	
1	Dibart <i>et al.</i> (1998)	Caso-controlo	Casos	24	Pacientes do Centro de investigação clínica em periodontologia	Desconhecida
		Controlos	27			
2	Colombo <i>et al.</i> (2006)	Caso-controlo	Casos	120	Pacientes com periodontite crónica moderada a grave da Universidade Federal do Rio de Janeiro	Não fumadores (51%) Ex-fumadores (27%) Fumadores (22%)
		Controlos	92			
3	Colombo <i>et al.</i> (2007)	Caso-controlo	Casos	175	Pacientes com periodontite crónica moderada a grave da Universidade Federal do Rio de Janeiro	Desconhecida
		Controlos	68			
B. Características da intervenção						
#	Amostra	Características do local da amostra	Intervenção	Microorganismos	Diferenças microbiológicas	
1	Células epiteliais de bolsas periodontais	Casos	PPD = 6,5	DNA-DNA checkerboard	<i>P. gingivalis</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>T. forsythia</i> , <i>T. denticola</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>P. nigrescens</i> , <i>C. ochracea</i> , <i>F. nucleatum subsp vicentii</i> , <i>C. retus</i> , <i>V. parvula</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. intermedius</i> e <i>P. micros</i>	Aa. (16,7% vs. 0%, p=0,043) Tf. (75% vs. 11,1%, p<0,001) Pi. (54,2% vs. 7,4%, p<0,001) Co. (37,5% vs. 0%, p<0,001) Cr.(29,2% vs. 0%, p=0,003)
		Controlos	PPD = 2,5			
2	Células epiteliais de bolsas periodontais	Casos	PPD = 5,8 ± 0,3 CAL = 6,8 ± 0,3	DNA-DNA checkerboard	<i>P. gingivalis</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>T. forsythia</i> , <i>T. denticola</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>P. nigrescens</i> , <i>C. ochracea</i> , <i>F. nucleatum subsp vicentii</i> , <i>C. retus</i> , <i>V. parvula</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>P. micros</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>A. viscosus</i> , <i>A. odontolyticus</i> , <i>A. israelii</i> , <i>A. gerencseriae</i> , <i>C. sputigena</i> , <i>C. gingivalis</i> , <i>C. showae</i> , <i>E. nodatum</i> , <i>E. corrodens</i> , <i>F. periodonticum</i> , <i>F. nucleatum subsp. polymorphum</i> , <i>F. nucleatum subsp. nucleatum</i> , <i>G. morbillorum</i> , <i>L. buccalis</i> , <i>N. mucosa</i> , <i>P. acnes</i> , <i>S. anginosus</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>S. mitis</i> e <i>S. noxia</i>	Não se observaram diferenças estatisticamente significativas em relação a bactérias específicas
		Controlos	PPD = 1,8 ± 0,1 CAL = 2,3 ± 0,1			
3	Células epiteliais de bolsas periodontais, sulco crevicular e mucosa oral	Casos	PPD = 5,8 ± 0,3 CAL = 6,8 ± 0,3 PI = 86 ± 11 HPS = 70 ± 18	Hibridação fluorescente <i>in situ</i> Microscopia confocal	<i>P. gingivalis</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>T. forsythia</i> e <i>T. denticola</i> .	Não se observaram diferenças estatisticamente significativas em relação a bactérias específicas
		Controlos	PPD = 1,8 ± 0,1 CAL = 2,3 ± 0,1 PI = 27 ± 15; sem HPS			

PPD = Profundidade de sondagem (mm); CAL = perda de aderência clínica (mm); PI= índice de placa (%); HPS = hemorragia à sondagem; Aa=*A. actinomycetemcomitans*; Tf=*T. forsythia*; Pi=*P. intermedia*; Co = *C. ochracea*; Cr=*C. retus*; GBC= Contagens globais de bactérias no interior ou aderidas às células epiteliais (>100); DP=desvio padrão.

Outcomes

O principal *outcome* em análise foi o valor médio ou percentagem de patogénicos específicos intracelulares ou aderentes a células ou tecidos periodontais. O *outcome* secundário em análise foi a contagem global de bactérias inespecíficas intracelulares ou aderentes a células ou tecidos periodontais.

Perfil de evidência

Para classificar a evidência que emerge desta revisão sistemática foi utilizado o sistema *Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation* (GRADE) proposto pelo grupo de trabalho GRADE (Atkins D, 2004). Dois revisores (LM e MP) avaliaram a qualidade da evidência para os *outcomes*. Qualquer discordância foi resolvida após discussão adicional.

RESULTADOS

Pesquisa e seleção de resultados

A pesquisa bibliográfica inicial culminou na seleção de 440 artigos originais. A triagem por título e resumo permitiu selecionar 26 artigos (Saglie FR, 1982a e b; Allenspach-Petrzilka GE, 1983; Manor A, 1984; Saglie FR, 1985; Saglie FR, 1986; Christersson LA, 1987; Saglie FR, 1987, Saglie FR, 1988a e b; Riviere GR, 1991; Dibart S, 1998; Tonetti MS, 1998; Hillmann G, 1998; Reed SG, 2000; Ishizuka M, 2002; Rautemaa R, 2004; Noiri Y, 2004; Kubar A, 2005; Colombo AV, 2006; Colombo AV, 2007; Thiha K, 2007; Silva N, 2008; Kim YC, 2010; Guyodo H, 2012; Colombo AV, 2013) que cumpriam os critérios de elegibilidade para leitura integral. Um estudo estava escrito em japonês (Ishizuka M, 2002) e, por isso, foi automaticamente excluído. Vinte e dois estudos foram posteriormente excluídos por razões específicas: 3 estudos tinham um protocolo de estudo não relacionado com os objetivos da presente revisão sistemática (Tonetti MS, 1998; Hillmann G, 1998; Rautemaa R, 2004), 8 estudos não apresentavam grupo controlo (amostras de pacientes saudáveis) (Saglie FR, 1982a e b; Allenspach-Petrzilka GE, 1983; Manor A, 1984; Christersson LA, 1987; Thiha K, 2007; Silva N, 2008; Guyodo H, 2012), 1 estudo só apresentava amostras de um único doente (Noiri Y, 2004), 7 estudos não tinham os critérios de inclusão e de exclusão definidos (Saglie FR, 1985; Saglie FR, 1986; Saglie FR, 1987, Saglie FR, 1988a e b; Riviere GR, 1991; Kim YC, 2010) e, finalmente, 3 estudos foram excluídos por apenas incluírem patogénicos oportunistas (Reed SG, 2000; Kubar A, 2005; Colombo AV, 2013). A pesquisa manual ao longo da bibliografia dos artigos selecionados não originou nenhum artigo adicional. Assim, apenas 3 artigos foram incluídos na presente revisão sistemática.

Características gerais e heterogeneidade dos estudos

Os 3 estudos incluídos são estudos de caso-controlo com uma considerável heterogeneidade. Em todos os estudos foram excluídos indivíduos com doenças sistêmicas e com antibioterapia prévia nos últimos 6 meses. Dois estudos (# 2, # 3) também excluíram mulheres grávidas. Em dois estudos (# 2, # 3) os casos foram definidos como tendo profundidade de sondagem (PPD) e perda de aderência (CAL) ≥ 4 mm e os controlos como tendo PPD ≤ 3 mm e CAL < 4 mm, enquanto que no terceiro (# 1) os casos foram definidos como tendo PPD > 5 mm, HPS e supuração e os controlos como tendo PPD < 5 mm sem HPS ou supuração. Não há informações sobre o valor de corte para o CAL neste último estudo. Um estudo (# 2) forneceu informações sobre os hábitos tabágicos dos participantes, enquanto nos outros dois (# 1, # 3) esta informação não foi incluída. Nos estudos # 1 e # 3 os casos e controlos eram compostos por grupos separados de participantes enquanto no estudo # 2 cada participante forneceu amostras de locais caso e de locais controlo.

Dois estudos usaram o *DNA-DNA checkerboard* (# 1, # 2) para avaliar a presença de bactérias intracelulares ou aderentes contrastando com o estudo # 3, onde foi utilizada a técnica de FISH. Todos os estudos aplicaram sondas para a deteção de *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*. O estudo #1 também teve como objetivo a deteção de *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Capnocytophaga ochracea*, *Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii*, *Campylobacter rectus*, *Veillonella parvula*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus intermedius* e *Peptostreptococcus micros*. Para além destes microrganismos, o estudo # 2 também teve por objetivo detetar *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces odontolyticus*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces gerencseriae*, *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Campylobacter showae*, *Eubacterium nodatum*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium periodonticum*, *Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum*, *Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum*, *Gemella morbillorum*, *Leptotrichia buccalis*, *Neisseria mucosa*, *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis* e *Selenomonas noxia*. Para a contagem global de bactérias o estudo # 3 utilizou a sonda de DNA EUB338. Esta sonda é universal para eubactérias. Os estudos # 1 e # 3 inferiram a contagem de bactérias globais pelos dados disponíveis, mas não utilizaram nenhum método específico para a sua avaliação. As Informações detalhadas sobre as características de estudos são apresentadas na E2-Tabela 1.

Avaliação da qualidade

As pontuações para a qualidade dos artigos foram atribuídos de acordo com critérios pré-determinados (E2-Tabela 2). O maior nível de evidência, com baixo risco de confusão ou de viés e probabilidade moderada de relação causal, foi atribuído ao estudo #3.

Outcomes

Outcome principal - o estudo # 1 encontrou diferenças estatisticamente significativas (teste exato de Fisher) quanto à presença de *A. actinomycetemcomitans* (16,7% vs. 0%, $p = 0,043$), *T. forsythia* (75% vs. 11,1%, $p < 0,001$), *P. intermedia* (54,2% vs. 7,4%, $p < 0,001$), *C. ochracea* (37,5% vs. 0%; $p < 0,001$) e *C. rectus* (29,2% vs. 0%; $p = 0,003$) em células epiteliais provenientes de bolsas periodontais (casos) em comparação com células epiteliais provenientes de sulcos gengivais (controles). Os estudos # 2 e # 3 não encontraram diferenças estatisticamente significativas em relação a bactérias específicas.

Outcome secundário - Todos os três estudos reportaram que havia maior quantidade de bactérias dentro ou sobre células epiteliais recolhidas a partir de um local com patologia, quando comparado com um sulco gengival saudável, no entanto, só o estudo #3 apresentou dados objetivos. Neste estudo observou-se uma maior percentagem significativa (teste do qui-quadrado) de células epiteliais com mais de 100 bactérias (> 100) em bolsas periodontais de indivíduos com periodontite em comparação com as células epiteliais de sulcos gengivais saudáveis de indivíduos com periodonto saudável (35,8% vs. 0 %, $p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em células contendo 1-20 e 21-100 bactérias. Curiosamente, também não foram observadas diferenças significativas na percentagem de células epiteliais com 1-20, 21-100 ou > 100 bactérias em bolsas periodontais e sulcos gengivais de indivíduos com periodontite.

Perfil de evidência

Para a classificação da qualidade da evidência produzida diversos aspetos foram tidos em consideração. O desenho caso-controlo (observacional) de todos os estudos incluídos, o reduzido número de estudos, os dados imprecisos ou escassos, incerteza quanto à possibilidade de extrapolação e generalização dos dados e o alto risco de viés sugerem que os resultados obtidos estão sujeitos a limitações e, portanto, devem ser interpretados com cautela (muito baixa classificação de qualidade).

DISCUSSÃO

Esta revisão sistemática tentou reunir a evidência disponível sobre a presença *in vivo* de putativos agentes patogénicos periodontais nos tecidos periodontais e a sua relação com a doença periodontal.

Resumo dos principais resultados

Todos os estudos seleccionados descrevem a presença de bactérias intracelulares e / ou aderentes a células gengivais epiteliais, *in vivo*, em bolsas periodontais e em sulcos gengivais saudáveis. Estas observações não só corroboram os resultados *in vitro* desta capacidade bacteriana (Fives-Taylor P, 1995; Dorn BR, 1998; Belton CM, 1999; Mooney A, 2003; Saito A, 2009; Dickinson BC, 2011), mas também sustentam que a invasão dos tecidos periodontais ocorre mesmo na presença de um sistema imunitário hostil e aparentemente competente (potenciais casos com doenças sistémicas foram excluídos). Também confirmam que a invasão bacteriana, por si só, é um evento comum, tanto na saúde como na doença, tal como sugerido por vários autores (Noiri Y, 1997; Mager DL, 2003; Rudney JD, 2005a e b).

O estudo #1 encontrou significativamente *mais* *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *C. ochracea* e *C. rectus intracelular* ou aderidos a células epiteliais de bolsas

E2 | TABELA 2. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS ESTUDOS INCLUÍDOS NA REVISÃO SISTEMÁTICA

#		Pergunta clara e focada	Definição de critérios de exclusão	Seleção dos casos	Seleção dos controlos	Representatividade dos casos	Comparabilidade dos casos e controlos	Apuração da exposição	Ocultação	Análise estatística	Financiamento	Avaliação global
1	Dibart <i>et al.</i> (1998)	2	2	1	1	1	0	1	0	1	2	-
2	Colombo <i>et al.</i> (2006)	2	2	2	1	1	2	1	0	1	2	-
3	Colombo <i>et al.</i> (2007)	2	2	2	1	1	2	2	0	1	2	+

(0 = não cumprido, 1 = não cumprido adequadamente, 2 = cumprido adequadamente)

(++ Todos ou a maioria dos critérios foram cumpridos e caso não tenham sido cumpridos é muito improvável que esse facto altere as conclusões. + Alguns dos critérios foram cumpridos e é improvável que os critérios que não foram cumpridos ou não estão adequadamente descritos alterem as conclusões; - Alguns dos critérios foram cumpridos e os critérios que não foram cumpridos ou não se encontram adequadamente descritos são suscetíveis de alterar as conclusões).

periodontais quando comparado com sulcos saudáveis. No entanto, esta observação não foi apoiada pelos outros dois estudos de caso-controle. Na verdade, nenhum desses dois últimos estudos encontrou diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos patogênicos periodontais ao comparar a saúde e a doença.

A falta de consistência entre os resultados poderá resultar de diferentes abordagens metodológicas sobre a identificação microbiana e definições de caso e de controle. Nos estudos # 1 e # 2 foi utilizada a técnica de *DNA-DNA checkerboard*. Nesta técnica o limiar de detecção é de 10^4 células bacterianas da espécie procurada. Isto significa que foram apenas detetadas diferenças substanciais na carga bacteriana. O estudo #1 poderá ter, hipoteticamente, potenciado as diferenças observadas definindo casos como tendo supuração além de PPD > 5 mm e HPS. Uma maior carga microbiana e de PMN em bolsas supurativas comparativamente com sulcos saudáveis (Herrera D, 2000) poderá ser uma possível explicação para as diferenças significativas encontradas, com uma amostra tão pequena. O estudo #2 poderá ter, hipoteticamente, atenuados as possíveis diferenças existentes, ao comparar bolsas periodontais e sulcos gengivais dos mesmos indivíduos com periodontite. Tem sido reconhecido que um sulco saudável de indivíduos com periodontite possui um maior número de agentes patogênicos, quando comparado com indivíduos com um periodonto saudável (Riviere GR, 1996; Sakamoto M, 2004). No estudo # 3 foi utilizada a técnica de FISH. Nesta técnica, uma amostra foi considerada positiva quando pelo menos uma célula epitelial, em cada campo do microscópio observado, apresentava bactérias fluorescentes resultantes da hibridação com a sonda específica para espécie. O número de bactérias foi estimado por contagem direta. Ao contrário da técnica de *DNA-DNA checkerboard*, a técnica de FISH permite que diferenças mais pequenas sejam detetadas, no entanto, como os aglomerados de bactérias não são dispersados o número real de bactérias pode ser subestimado. Apesar disto, todos os estudos parecem ser unânimes em considerar que houve quantitativamente mais bactérias dentro ou sobre as células epiteliais colhidas a partir de um local doente em comparação com um sulco saudável.

A ausência de uma quantidade significativamente maior de periopatogênicos 'tradicionais' e o aparente aumento da flora 'comensal' na doença também pode ser interpretada com referência ao conceito de periopatogênico chave descrito por Hajishengallis (2012). De acordo com Hajishengallis, um patogênico-chave, especificamente a *P. gingivalis*, parece ser capaz de remodelar uma comunidade simbiótica para um estado 'disbiótico' ao enfraquecer a imunidade inata de um modo que favorece o crescimento descontrolado de outras espécies, enquanto é, ela própria, um constituinte minoritário da microbiota periodontal.

Limitações

Os estudos incluídos nesta revisão são todos estudos de caso-controlo não-randomizados. Apesar das inerentes limitações e menor nível de significância, as revisões sistemáticas de estudos observacionais de etiologia são especialmente importantes. Estes estudos são muitas vezes limitados em tamanho e, portanto, somente pela análise simultânea de dados de estudos semelhantes é que podemos ter uma verdadeira percepção sobre associações reais ou falsas (Dickersin K, 2002).

No que se refere, no entanto, aos objetivos desta revisão, o número reduzido e as limitações dos estudos incluídos opõem-se a uma alta ou mesmo moderada evidência de associação entre a invasão do periodonto por patogénicos periodontais e doença periodontal. Os dados atualmente disponíveis são de baixa qualidade e inconsistentes, em razão dos diferentes desenhos de estudo, descrições e registos incompletos e grande diversidade metodológica.

CONCLUSÃO

Não há evidência suficiente para apoiar ou excluir a invasão de patogénicos periodontais como passo fundamental na etiopatogenia da doença periodontal. Esta revisão destaca a necessidade de mais estudos sobre este tema. Pesquisas futuras devem assentar em estudos com maior tamanho amostral, com definições de casos e controlo claras garantindo representatividade dos casos e comparabilidade entre casos e controlos. É também importante verificar a exposição a patogénicos invasivos periodontais de forma mais detalhada (por exemplo, estirpes, intracelular / intercelular, sinergias) e garantindo a ocultação da análise.

Mendes L ¹, Rocha R ^{2,3,4}, Azevedo AS ², Catarina F ¹, Henriques M ³, Pinto MG¹,
Azevedo NF ^{2,4}

¹ Departamento de Periodontologia, Faculdade de Medicina Dentária, Universidade do Porto, Portugal.

² LEPABE – Laboratory for Process Engineering, Environment, Biotechnology and Energy, Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Portugal.

³ LIBRO – Laboratório de Investigação em Biofilmes Rosário Oliveira, Universidade do Minho, Braga, Portugal.

⁴ BIOMODE, Zona Industrial da Gandra, Apartado 4152, 4806-909 Guimarães, Portugal.

Objetivo: Desenvolver sondas de PNA para a identificação e localização de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* em amostras de placa subgengival e biópsias gengivais, pelo método de FISH.

Introdução: A complexidade da etiopatogénese das doenças periodontais justifica um aprofundado conhecimento dos biofilmes periodontais e sua interação com as células hospedeiras. A compreensão da dinâmica periodontal, *in situ*, é crucial para melhorar o diagnóstico e definir tratamentos mais racionais e eficazes. A técnica de FISH com sondas para alvos no rRNA pode ser utilizada para identificar microrganismos e compreender as relações microbianas dentro de amostras complexas. As sondas de PNA foram desenvolvidas para superar as limitações das sondas convencionais de DNA, trazendo robustez e maior sensibilidade e especificidade à técnica de FISH convencional.

Métodos: Foi desenhada uma sonda de PNA para cada microrganismo. O método PNA-FISH foi otimizado para permitir uma hibridação simultânea (PNA-FISH *multiplex*). Depois de testado em estirpes representativas de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, o método PNA-FISH foi adaptado para a deteção de microrganismos na placa subgengival e biópsias gengivais de pacientes com periodontite grave.

Resultados: As melhores condições de hibridação para as duas sondas (PgPNA1007 e AaPNA235) foram alcançadas à temperatura de 59°C, durante 150 minutos. A sensibilidade e especificidade *in silico* foram ambas de 100% para a sonda PgPNA1007 e de 100% e 99,9% para a sonda AaPNA235, respetivamente. Os resultados em amostras clínicas revelaram que o método de PNA-FISH foi capaz de detetar e discriminar as bactérias alvo numa população microbiana mista de placa subgengival e em biópsias de tecidos gengivais.

Conclusão: Esta investigação apresenta um novo método para discriminar e co-localizar *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* em amostras clínicas em apenas algumas horas. Com esta técnica foi possível observar, pela primeira vez, a distribuição espacial simultânea destas espécies em biópsias de tecido gengival organizado, pela técnica de FISH.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécies bacterianas e técnicas de cultura

Estirpes de *P. gingivalis*, provenientes de isolados clínicos e de culturas tipo, foram gentilmente cedidas pelo Professor Mike Curtis (Universidade Queen Mary, Londres) e pelo Professor Koji Nakayama (Universidade de Nagasaki, Nagasaki). Estirpes de *A. actinomycetemcomitans*, provenientes de culturas tipo foram gentilmente cedidas pelo Professor Casey Chen (Universidade de Southern California, California).

Todas as estirpes foram mantidas em *trypticase soy agar* (TSA) (VWR, Portugal), suplementado com 5% (vol / vol) de sangue de carneiro desfibrinado (Probiológica, Portugal). As placas foram incubadas a 37°C em condições anaeróbicas (sistema de geração de AnaeroGen Ambiente; Oxoid, Reino Unido). As colónias foram repicadas em placas frescas a cada 5-7 dias.

Desenho e síntese das sondas de PNA

Uma sonda de PNA foi desenvolvida para cada bactéria alvo seguindo os seguintes passos. Oligonucleotídeos potencialmente úteis com 15 pb foram identificados recorrendo ao programa Primerose (<http://www.cf.ac.uk/biosi/research/biosoft/Primerose/index.html>) utilizando a base de dados de rRNA 16S do RDP-II (<http://rdp8.cme.msu.edu/html/>, último acesso em agosto de 2014). A seleção da sequência foi baseada na comparação da mesma com o rRNA 16S de cinco estirpes escolhidas aleatoriamente. Para evitar a perda de possíveis sequências de interesse, vários conjuntos aleatórios de cinco estirpes foram comparados. De seguida foram aplicados vários critérios a fim de selecionar as melhores sondas de PNA-FISH, a saber: deteção de elevado número de microrganismos alvo e baixo número de deteção de não-alvos; inexistência de autocomplementaridade; previsão de temperatura de hibridação semelhante para ambas as sondas; e, elevado teor de guanina e citosina. As sequências selecionadas foram sintetizadas (Panagene, Coreia do Sul), sendo o terminal N das sondas de PNA para *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* ligado ao fluorocromo Alexa Fluor 488 e 594, respetivamente, através de uma ligação dupla AEEA (*ácido -8-amino-3,6-dioxa octanoico*).

Determinação da sensibilidade, especificidade e afinidade de hibridação teóricas

A sensibilidade e especificidade teórica foram avaliadas recorrendo às bases de dados atualizadas disponíveis no RDP-II e posteriormente confirmadas por uma pesquisa no programa BLASTn do NCBI disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, tendo sido apenas incluídas sequências alvo de boa qualidade e com pelo menos 1200 pb (Almeida C, 2010). Resumidamente, a sensibilidade e especificidade teórica foram

calculadas de acordo com as fórmulas $\text{alvos}/\text{total de alvos} \times 100$ e $\text{n\~ao-alvos}/\text{total n\~ao-alvos} \times 100$, onde 'alvos' representa o número de estirpes alvo detetadas pela sonda oligonucleotídica, 'total de alvos' representa o número total de estirpes alvo presente na base de dados, 'n\~ao-alvos' representa o número de estirpes n\~ao-alvo que não reagiram com a sonda de oligonucleótidos e 'total de n\~ao-alvos' representa o total de estirpes n\~ao-alvo encontrada na base de dados. A afinidade de hibridação foi determinada no mapa de acessibilidade da subunidade 16S do rRNA a sondas oligonucleotídicas, com marcadores fluorescentes, estabelecido por Fuchs *et al.* (1998).

Otimização do protocolo de PNA-FISH *multiplex*

Cada uma das sondas desenvolvidas foi previamente testada e otimizada antes de ser aplicada em amostras clínicas. O método de hibridação em lâminas baseou-se no procedimento previamente descrito por Almeida *et al.* (2010), com algumas modificações no tempo e na temperatura de hibridização que foram ajustados por forma a obter o maior sinal possível para ambos os microrganismos em simultâneo (PNA-FISH *multiplex*). Para isso, vários tempos e temperaturas de hibridação foram testadas em várias estirpes dos microrganismos alvo e, subsequentemente, avaliados os resultados por microscopia epifluorescente. Para tal, as células recolhidas a partir de culturas em placas de TSA suplementado com 5% (v/v) de sangue de carneiro desfibrinado, com três dias de evolução, foram recolhidas, suspensas em água estéril e homogeneizadas num *vortex* durante 1 min. De seguida, e utilizando lâminas de vidro de 3-poços, 30 μL da suspensão de cada estirpe foi desidratada, em estufa, a 55°C, durante aproximadamente 15 minutos e imediatamente imersa em 4% de paraformaldeído (p/v), seguido de etanol a 50% (v/v), durante 10 min cada, à temperatura ambiente.

Os esfregaços agora fixados foram recobertos com 20 μL de solução de hibridação que continha sulfato de dextrano 10% (p/v) (Fisher), NaCl 10 mM (Panreac), polivinilpirrolidona 0,2% (p/v) (Sigma), Ficoll 0,2% (p/v) (Fisher), EDTA dissódico 5 mM (Panreac), Triton X-100 0,1% (v/v) (Panreac), Tris-HCl 50 mM (pH 7,5; Fisher) para além de sonda PNA 200 nM. Depois de cobertas com lamelas, as lâminas foram colocadas em câmaras húmidas e incubadas durante 150 minutos a 59°C. Terminada a hibridização, as lamelas foram removidas, as lâminas submersas e mantidas numa solução de lavagem pré-aquecida (59°C) contendo Tris base 5 mM (Fisher), NaCl 15 mM (Panreac) e Triton X 0,1% (v/v) (pH 10; Panreac) durante 30 min e, em seguida, deixadas a secar ao ar, num local escuro durante um período máximo de 24 horas antes da microscopia. Para cada experiência um controlo negativo foi efetuado recorrendo a solução de hibridização sem sonda. Além disso, as sondas foram testadas contra alguns microrganismos taxonomicamente próximos e /ou possíveis colonizadores da cavidade oral.

Finalmente, para assegurar que cada uma das sondas mantinha o seu comportamento em *multiplex*, uma mistura com igual proporção das duas sondas de PNA foi aplicada simultaneamente num esfregaço misto das duas espécies alvo (*A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*). Para isso, foram misturados 10 mL de uma suspensão de cada uma das espécies alvo. Esta foi colocada sobre lâminas e a hibridação foi realizada como descrito acima.

Discriminação e localização de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* em amostras clínicas por PNA-FISH

Recolha de amostras clínicas

As amostras clínicas foram recolhidas a partir de uma amostra de conveniência de 5 pacientes adultos utentes da clínica da Faculdade de Medicina Dentária do Porto. Todos os pacientes foram diagnosticados com periodontite grave, não apresentavam comorbilidades e não haviam sido submetidos a qualquer tratamento antimicrobiano nos últimos 3 meses. Foi obtido consentimento informado, por escrito, antes da recolha da amostra, de acordo com o protocolo do estudo, aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Dentária do Porto.

As amostras de placa subgingival foram recolhidas usando curetas Gracey (Hu-Friedy®) estéreis, após o isolamento do dente com rolos de algodão e remoção da placa bacteriana supragingival com bolinhas de algodão estéreis. As amostras foram suspensas em soro fisiológico (NaCl 0,9%) estéril e processadas imediatamente. As amostras gengivais foram recolhidas durante a cirurgia periodontal ou durante a extração de dentes com grave comprometimento periodontal. As amostras gengivais foram colocadas individualmente em 4% (p/v) de paraformaldeído e guardadas a 4°C até posterior utilização.

Validação PNA-FISH em amostras clínicas

As suspensões de placa subgingival foram centrifugadas a 10000 x g durante 5 minutos. Os sedimentos foram depois ressuspensos em 400 µL de 4% (p/v) de paraformaldeído durante 1 hora, antes de serem centrifugados de novo. As células fixadas foram ressuspensas novamente em 500 µL de 50% (v/v) de etanol e armazenadas a -20°C, até posterior utilização. Para a hibridação, uma alíquota de 30 µL de células fixadas foram montadas em lâminas de vidro de três poços e deixadas a secar ao ar.

As biópsias de tecidos gengivais foram embebidas em parafina, cortadas com espessura de 3 µm e montadas em lâminas de vidro para microscopia. Antes da hibridação, as lâminas foram imersas duas vezes em xilol durante 15 min cada e, em

seguida, reidratadas por concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 80%, 70% e 50%) durante 5 min cada vez. Finalmente, foram lavadas com água destilada, durante 10 minutos, e deixadas a secar ao ar. Foi adicionado a cada amostra clínica 20 µL de solução de hibridação contendo ambas as sondas e a hibridização prosseguiu como anteriormente descrito.

Visualização por microscopia

Antes da microscopia, as amostras para visualização foram montadas com uma gota de óleo de imersão não fluorescente (Leica) e cobertas com lamelas. A imagem foi adquirida usando um microscópio de epifluorescência Leica DM LB2 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) acoplado a uma câmara Leica DFC300 FX (Leica Microsystems GmbH, Alemanha) equipada com filtros sensíveis às moléculas Alexa Fluor utilizadas. Os filtros que não eram capazes de captar a fluorescência da sonda foram usados para confirmar a ausência de autofluorescência. Todas as imagens foram obtidas usando o *software* Leica IM50 gerenciador de imagens, processamento de imagem e de arquivamento, usando uma ampliação de x1000. Para fins de *multiplex*, as mesmas imagens de campo foram obtidos com cada um dos filtros, para a sonda de PNA correspondente, e sobrepostos.

RESULTADOS

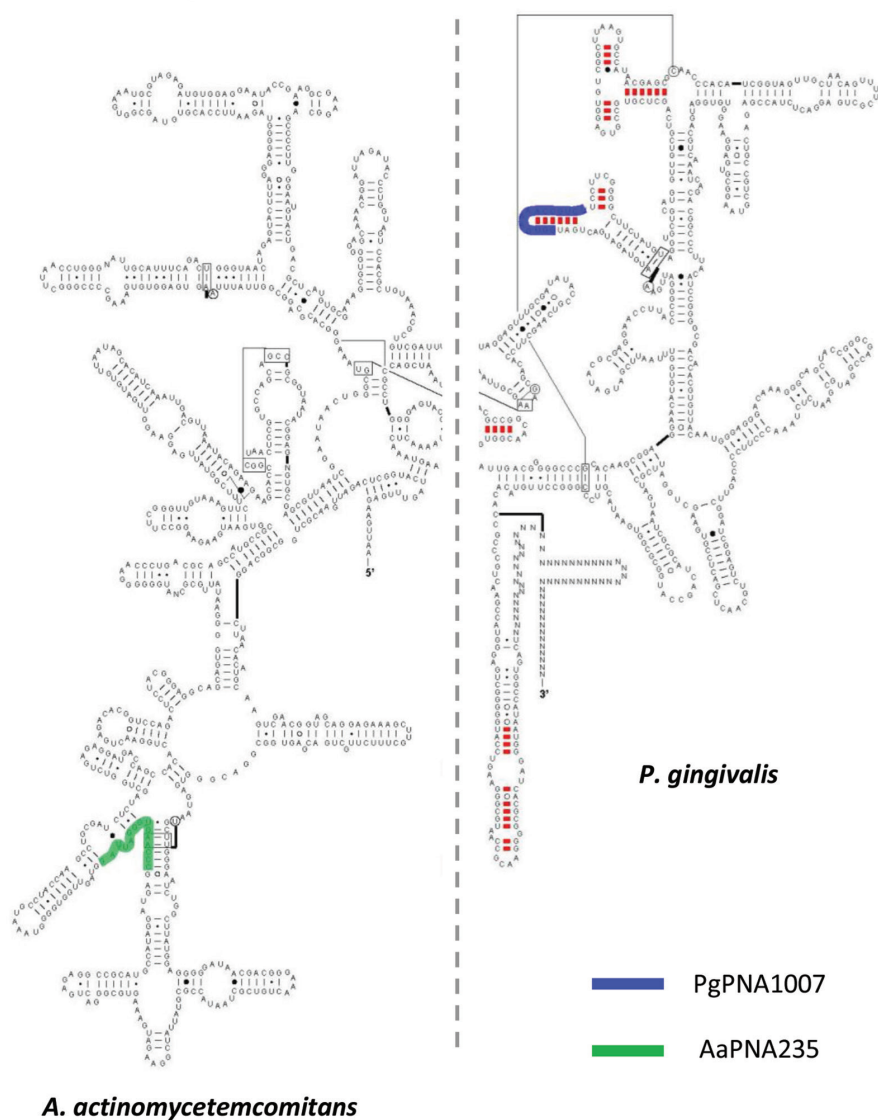
Desenho das sondas de PNA e determinação da sensibilidade, especificidade e afinidade de hibridação teóricas.

O objetivo inicial deste trabalho era desenhar sondas de PNA altamente sensíveis e específicas para *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* que permitissem hibridação em *multiplex* pela técnica de PNA-FISH. Para o *A. actinomycetemcomitans* foi obtida a seguinte sequência de 15 pb: 5'-CTAATCACACTTGGG-3'. Esta sonda hibrida entre as posições 235 e 250 da estirpe de *A. actinomycetemcomitans* (T) e, por isso, foi designada AaPNA235. Para a detecção de *P. gingivalis* foi obtida a sonda PgPNA1007 com uma sequência de 14 pb (5'-AGACGGTTTTTACC-3') entre as posições 1007 e 1022 da estirpe de *P. gingivalis* (T). Atendendo às posições de hibridação, a afinidade das sondas para as zonas alvo estabelece uma intensidade da fluorescência esperada classe V para a sonda PgPNA1007 e classe IV para a sonda AaPNA235 (E3-Figura 1).

Foi necessária a redução de 1 pb, para aproximar os valores da temperatura de hibridação de ambas as sondas. Esta diminuição no comprimento da sonda não afetou a sensibilidade e especificidade teórica comparativamente à sonda inicial de 15 pb (dados não apresentados). De acordo com a base de dados RDP-II, a sonda

AaPNA235 é totalmente complementar com todas as 73 sequências alvo de *A. actinomycetemcomitans*. Da mesma forma, a PgPNA1007 foi totalmente complementar com todas as 43 sequências alvo de *P. gingivalis* existentes, mas também com uma bactéria não-alvo: *Porphyromonas gulae* (S000390658). Assim, 100% de sensibilidade e especificidade foi determinada para a sonda de AaPNA235, enquanto a sonda PgPNA1007 alcançou 100% de sensibilidade e 99,9% de especificidade (E3-Tabela 1).

Estrutura secundária do RNA da subunidade pequena do ribossoma



E3 | FIGURA 1. Esquema da localização das sequências alvo de cada sonda. A estrutura secundária do RNA da subunidade pequena do ribossoma foi adaptado de <http://www.rna.icmb.utexas.edu/> (último acesso julho de 2015).

E3 | TABELA 1. SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE TEÓRICA DAS SONDAS DE PNA OU DNA PARA A DETECÇÃO DE AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS E PORPHYROMONAS GINGIVALIS

Bactéria	Sonda	Sequência (5' → 3')	Número de estirpes alvo detectadas ^a	Número de estirpes não-alvo detectadas ^a	Sensibilidade (%) ^b	Especificidade (%) ^c	Bibliografia	
A. <i>actinomycetemcomitans</i>	DNA	Aa889	CACCAGGGCTAAACCCCAAT	50	0	68,5	100	Rudney JD, 2001; Colombo AV, 2007; Stolttenberg JL, 1993; Rudney JD, 2005 a e b; Johnson JD 2008; Sunde PT, 2003
	DNA	Aa829	GGGCTAAACCCCAATCCC	50	0	68,5	100	Zlinge V, 2010 a
	PNA	Aa235	CTAATCACACTTGGG	73	0	100	100	Este estudo
	DNA	Pg1054	GGTTTCACCATCAGTCATCTACA	16	0	37,2	100	Rudney JD, 2001; Colombo AV, 2007; Stolttenberg JL, 1993; Rudney JD, 2005 a e b; Johnson JD 2008
<i>P. gingivalis</i>								
	DNA	Pg477	CAATACTCGTATCGCCCGTTATTTC	43	1	100	99,9	Zlinge V, 2010 a Sunde PT, 2003
	PNA	Pg1007	AGACGGTTTTCACC	43	1	100	99,9	Este estudo

^a Calculado pelo Probe Match, em <http://rdp8.cme.msu.edu/html/>, último acesso em agosto de 2014) com as seguintes opções: Strain - Both, Source - Both, Size - > 1200 pb; Quality - Both.
^b Sensibilidade calculada segundo a fórmula: (alvos / T(alvos X100)
^c Especificidade calculada segundo a fórmula: (não-alvos / T(não-alvos X 100

Os alinhamentos múltiplos de sequências utilizando o programa BLASTn revelaram a existência de *mismatches* de 1pb com outras espécies bacterianas que compõem o microbioma humano ou são conhecidos agentes patogênicos em humanos (E3-Figura 2). Porém, para nenhuma destas espécies está descrita a cavidade oral humana como reconhecido local de colonização. A *P. gulae* tem sido exclusivamente associada à colonização da cavidade oral de vários animais (Fournier D, 2001), porém um estudo recente identificou *P. gulae* na cavidade oral de nativos sul-americanos (Gaetti-Jardim E Jr, 2015), com uma dieta tradicional.

	5' CTAATCACACTTGGG 3' AaPNA235	
<i>Haemophilus influenzae</i> strain 680	GATTAGG GTGAACCC	246
<i>Aggregatibacter aphrophilus</i> NJ8700 strain NJ8700	GATTAGG GTGAACCC	240
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd KW20	GATTAGG GTGAACCC	246
<i>Haemophilus ducreyi</i> 35000HP strain 35000HP	GATTAGG GTGAACCC	246
<i>Haemophilus sputorum</i> strain CCUG 13788	GATTAGG GTGAACCC	222
<i>Haemophilus haemolyticus</i> strain CIP 103290	GATTAGG GTGAACCC	226
<i>Haemophilus paraphrohaemolyticus</i> strain NCTC 10670	GATTAGG GTGAACCC	220
	5' AGACGGTTTTTACC 3' PgPNA1007	
<i>Porphyromonas gulae</i> strain JCM 13865	TCTGCCG AAAAGTGG	1004

E3 | FIGURA 2. Alinhamento parcial de sequências 16S rRNA de bactérias com uma diferença num par de bases com as sondas AaPNA235 e PgPNA1007. Os números da coluna da direita indicam a posição de hibridação.

Otimização do protocolo PNA-FISH

Foram realizados múltiplos ensaios para a otimização do protocolo de PNA-FISH em várias estirpes de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*. Partindo de temperaturas entre os 57 e os 61°C e variando os tempos de hibridação entre os 60 e os 180 min (dados não apresentados) foram encontradas as melhores condições para hibridação simultânea de ambas as sondas com o seu microrganismo alvo a 59°C durante 150 min (E3-Figura 3). Dos 57 aos 61°C a hibridação da sonda AaPNA235 evidenciou um forte *signal-to-noise ratio* a partir dos 90 até aos 150 min, mas o mesmo só foi observado para a PgPNA1007 a 59°C durante 150 min. Como esperado, pela análise *in silico*, ambas as sondas hibridaram com várias estirpes do seu microrganismo alvo, não se observando qualquer hibridação cruzada (E3-Tabela 2). Adicionalmente observou-se que, nestas

condições, ambas as sondas mantinham o seu comportamento quando adicionadas simultaneamente a uma amostra contendo os dois microrganismos alvo, fornecendo uma discriminação exata entre as duas espécies envolvidas, como mostrado na E3-Figura 4. O filtro de imagem verde apresenta um fundo vermelho ligeiramente visível, devido a uma pequena sobreposição entre o espectro de absorção do Alexa Fluor 594 (vermelho) e o filtro de excitação utilizado para visualizar a sonda PgPNA1007.

E3 | TABELA 2. RESULTADO DOS TESTES DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DAS SONDAS DE PNA PARA O *AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS* E *PORPHYROMONAS GINGIVALIS* DESENVOLVIDAS NESTE ESTUDO

Microrganismo	AaPNA235	PgPNA1007
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ANH	+	-
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> D115	+	-
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> D75	+	-
<i>Porphyromonas gingivalis</i> GAI	-	+
<i>Porphyromonas gingivalis</i> TDC 60	-	+
<i>Porphyromonas gingivalis</i> 13.3.3 ^a	-	+
<i>Porphyromonas gingivalis</i> w83	-	+
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 ^b	-	+
<i>Porphyromonas gingivalis</i> w50	-	+
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 ^c	-	+
<i>Porphyromonas gingivalis</i> 34.2.2 ^a	-	+
<i>Porphyromonas endodontalis</i> ^a	-	-
<i>Escherichia coli</i> CECT 434	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> RP61A	-	-

^a isolado clínico

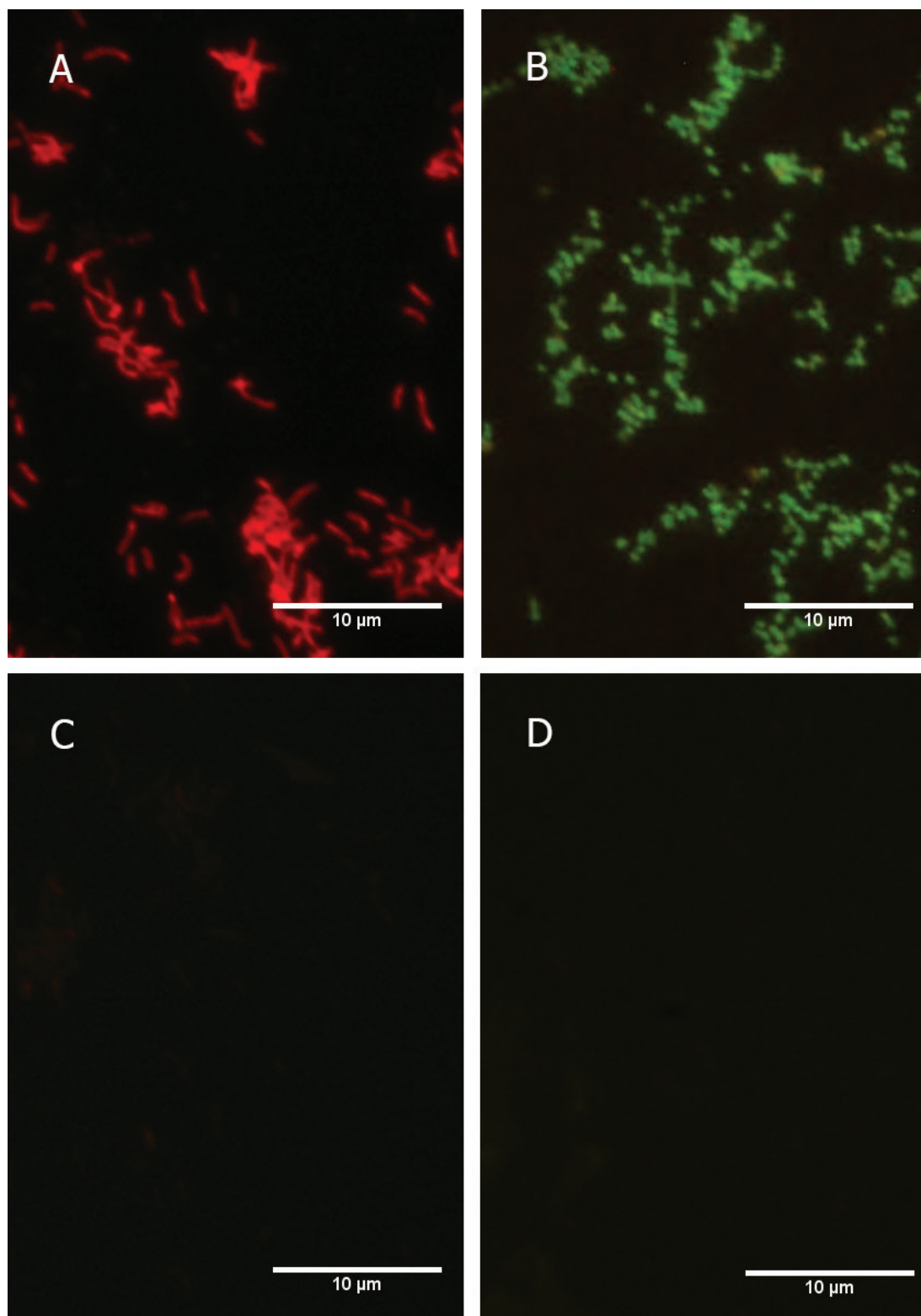
^b de Prof. M Curtis

^c de Prof. K Nakayama

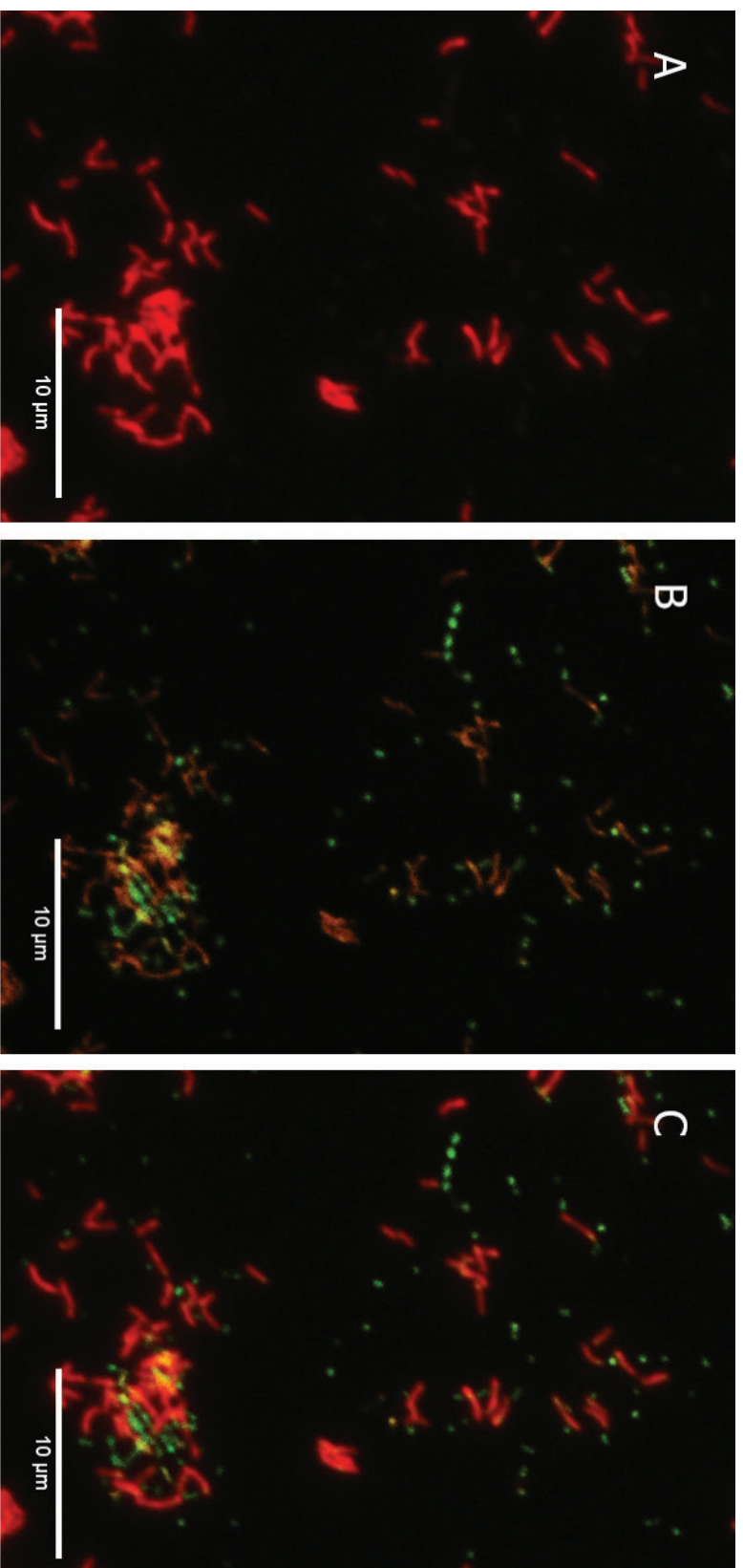
Validação PNA-FISH em amostras clínicas

Estando o protocolo de PNA-FISH *multiplex* otimizado, foi testada a capacidade das sondas desenvolvidas para discriminar o microrganismo alvo, em amostras clínicas polimicrobianas. A aplicação da técnica a amostras de placa bacteriana subgengival revelou ausência de *A. actinomycetemcomitans* na nossa amostra de conveniência. Pelo contrário, a *P. gingivalis* mostrou-se presente e exibiu ocasionalmente uma organização em microcolónias (E3-Figura 5).

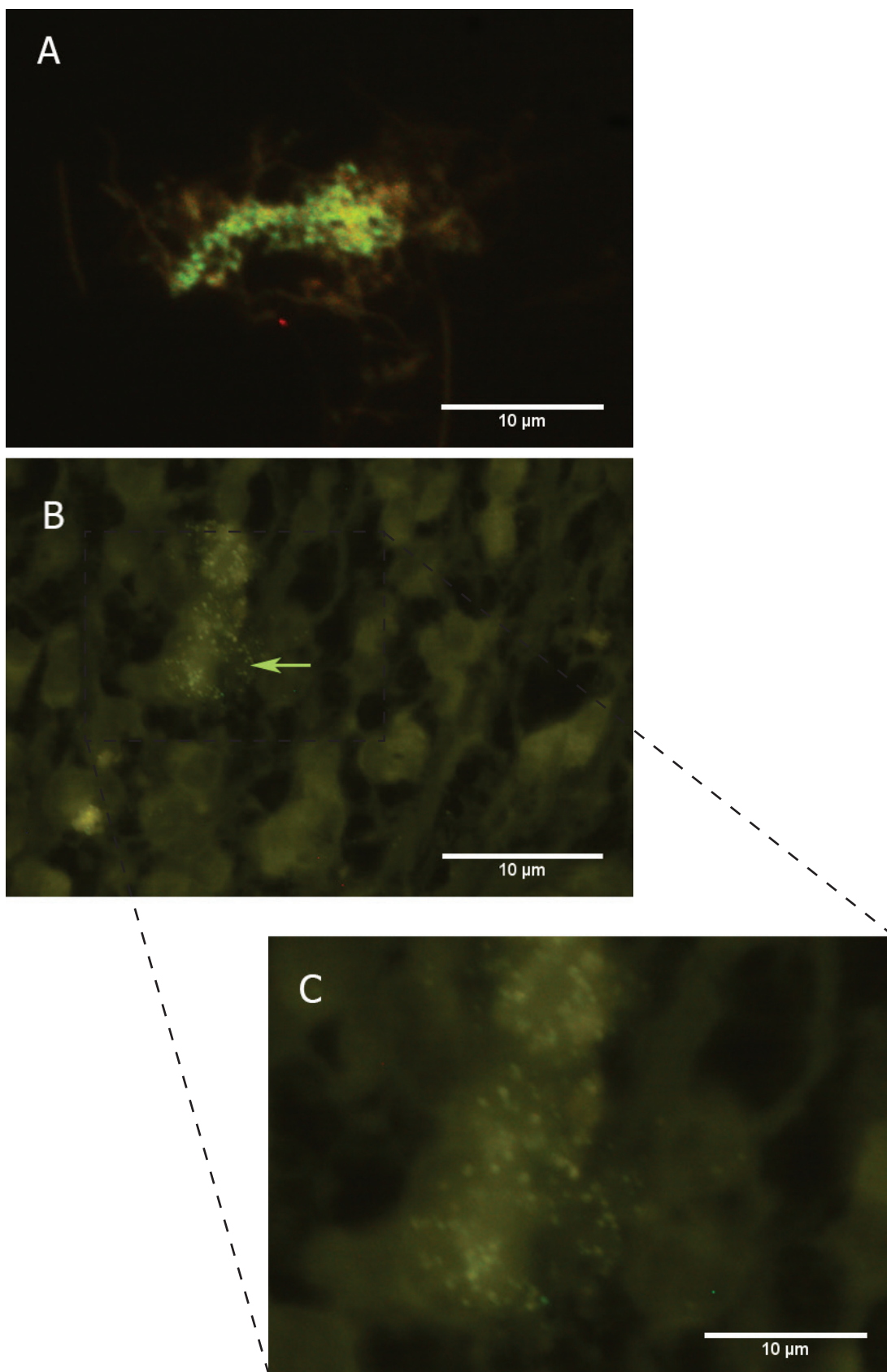
Os resultados em biópsias de tecido gengival mostraram que as sondas AaPNA235 e PgPNA1007 foram capazes de detetar, discriminar e co-localizar ambas as espécies (E3-Figura 6). A *P. gingivalis* foi detetada em maior número e mais frequentemente que o *A. actinomycetemcomitans*. Ademais, foi interessante observar a existência de células super-invasidas por *P. gingivalis* a contrastar com células não invadidas ou pouco invadidas (E3-Figura 5).



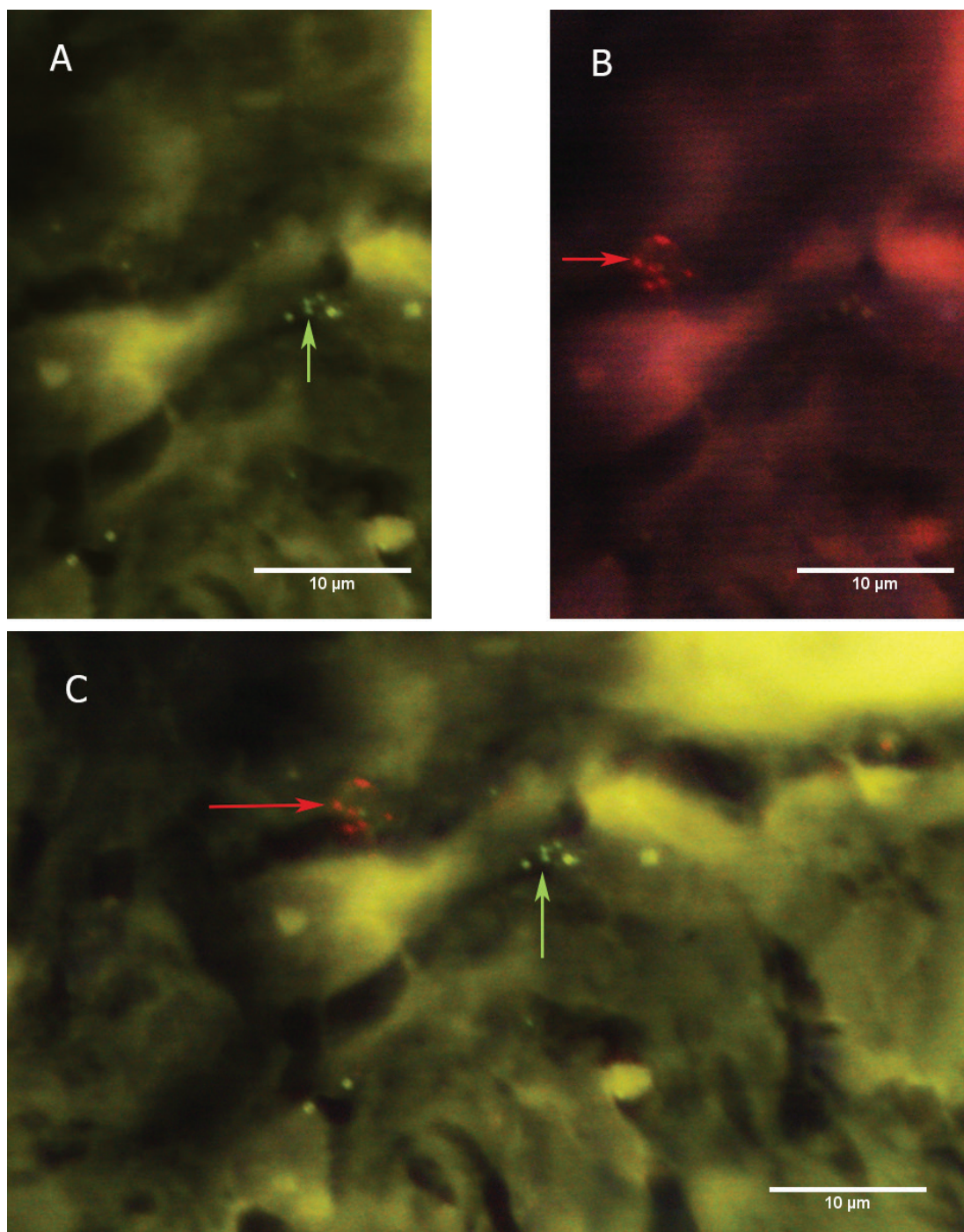
E3 | FIGURA 3. Imagem de culturas puras de (A) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (vermelho) e (B) *Porphyromonas gingivalis* (verde) após PNA- FISH e microscopia epifluorescente. Painéis (C) e (D) mostram os controles negativos de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, respectivamente.



E3 | FIGURA 4. Imagens de *multiplex* PNA-FISH numa suspensão com duas espécies. O painel (A) mostra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (filtro vermelho), o painel (B) mostra *Porphyromonas gingivalis* (filtro verde) e o painel (C) mostra as imagens, do mesmo campo, sobrepostas.



E3 | FIGURA 5. Imagem da detecção de *Porphyromonas gingivalis* após PNA-FISH e microscopia epifluorescente numa amostra de placa subgingival (A) e numa biópsia gengival (B). Note-se a invasão celular de *P. gingivalis* (seta verde) em pormenor no painel (C).



E3 | FIGURA 6. Imagens de *multiplex* PNA-FISH em biópsia gengival. O painel com filtro verde (**A**) mostra a presença de *Porphyromonas gingivalis* (seta verde), o painel com filtro vermelho (**B**) mostra a presença de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (seta vermelha), e o painel (**C**) mostra as imagens, do mesmo campo, sobrepostas.

DISCUSSÃO

Ao longo dos anos, vários autores têm tentado clarificar o processo etiopatogénico das doenças periodontais e, mais concretamente, o evento responsável pela disrupção da homeostasia entre a microbiota subgengival e as defesas do hospedeiro. A invasão bacteriana dos tecidos periodontais tem sido apontada como o mecanismo chave deste processo. No entanto, as dificuldades em visualizar, discriminar, localizar e quantificar uma flora polimicrobiana intragengival de forma reprodutível, rápida e pouco onerosa têm dificultado uma associação definitiva (Tribble GD, 2010). Uma revisão sistemática realizada pelo nosso grupo de estudo mostrou que não existe evidência científica suficiente que permita suportar a invasão de patógenos periodontais como passo fundamental na etiopatogenia da periodontite devido à escassez de estudos e às fortes limitações e heterogeneidade que a metodologia desses estudos apresenta (Mendes L, 2015).

Este trabalho tem como objetivo contribuir para melhorar o conhecimento sobre este possível mecanismo patogénico através do desenvolvimento de sondas de PNA altamente sensíveis e específicas para a deteção simultânea de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*.

A avaliação da sensibilidade e especificidade teórica permitiu comparar ambas as sondas de PNA com as sondas anteriormente desenvolvidas para a deteção *in situ* dos mesmos microrganismos (E3-Tabela 1). A sonda PgPNA1007 apresenta um desempenho teórico superior na deteção de *P. gingivalis* à sonda de DNA utilizada em vários estudos prévios (Stoltenberg JL, 1993; Rudney JD, 2001; Sunde PT, 2003; Rudney JD, 2005 a e b; Colombo AV, 2007; Johnson JD, 2008). O seu desempenho teórico só é comparável à sonda de DNA previamente desenvolvida por Sunde *et al.* (Sunde PT, 2003). Porém, e de acordo com o mapa desenvolvido por Fuchs *et al.* (1998), a sonda PgPNA1007 hibrida numa área com maior afinidade de hibridação (classe V) quando comparada com a sonda Pg477 (classe VI). Além disso, as sondas de PNA podem hibridar com baixas concentrações salinas envolvendo o que destabiliza as estruturas secundárias do rRNA. Desta forma, o acesso das sondas às sequências alvo é melhorado e, conseqüentemente, é potenciada a intensidade do sinal esperado. Ainda assim, são necessários 150 minutos para alcançar o melhor *signal-to-noise ratio* o que poderá ser explicado pelo facto de a sonda PgPNA1007 hibridar ainda assim numa zona de difícil acesso. Além disso, a complexa estrutura dos invólucros bacterianos da *P. gingivalis* com duas moléculas de LPS (O-LPS e A-LPS) como constituintes da parede celular e a existência de uma densa matriz polissacarídica a encapsular várias estirpes poderá ser o motivo pelo qual os tempos de hibridação não foram significativamente melhorados em relação à sonda de DNA (Arndt A, 2010). A sonda AaPNA235 mostra claramente maior sensibilidade quando comparada com todas as sondas utilizadas nos estudos acima mencionados (Stoltenberg JL, 1993; Rudney JD, 2001; Rudney JD, 2005 a e b; Colombo AV, 2007; Johnson JD, 2008; Zijng V,

2010a), e por isso uma melhor discriminação é esperada. Adicionalmente, as sondas de PNA desenvolvidas possuem uma sequência de oligonucleotídeos mais curta o que tendencialmente as torna menos tolerantes a *mismatches* (Fontenete S, 2015). Ademais, a natureza hidrofóbica das moléculas de PNA potencia a penetração celular e a difusão através do biofilme e, por serem mímcos de DNA, são intrinsecamente mais resistentes à atividade enzimática a partir da célula bacteriana ou a partir do microambiente circundante. Por conseguinte, é expectável uma eficiência superior da técnica de PNA-FISH na deteção de *A. actinomycescomitans* e *P. gingivalis* (Drobniewski FA, 2000; Almeida C, 2011). As melhores condições de hibridação foram encontrados a 59°C durante 150 min, o que torna o nosso protocolo FISH tão rápido como o descrito anteriormente para o DNA-FISH (Stoltenberg JL, 1993; Rudney JD, 2001; Sunde PT, 2003; Rudney JD, 2005 a e b; Colombo AV, 2007; Johnson JD, 2008; Zijng V, 2010a) e adequado tanto para fins clínicos, se se provar útil (Colombo AP, 2009; Hong BY, 2015; Sayehmiri F, 2015), como de investigação.

Os resultados mostraram que as sondas foram capazes de detetar e discriminar simultaneamente *P. gingivalis* e *A. actinomycescomitans* numa suspensão com as duas espécies. Além disso, observou-se ausência de hibridização com outras espécies bacterianas, corroborando a previsão teórica.

A aplicação em amostras clínicas demonstrou a capacidade de discriminar, *in situ*, ambas as espécies simultaneamente, reforçando o valor acrescentado desta técnica. As nossas amostras clínicas apresentaram uma reduzida quantidade global de ambas as espécies, apesar da gravidade da doença periodontal, na nossa amostra de conveniência. Observou-se a *P. gingivalis* organizada em micro-colónias na placa subgingival e internalizada nos tecidos gengivais onde, foi interessante notar que, coexistiam células arredondadas sobrecarregadas de bactérias com células não invadidas ou pouco invadidas. Os estudos de Colombo *et al.* (2007) e Rudney *et al.* (2005a e b), em raspados de células epiteliais de bolsas periodontais e de mucosa oral, também relataram observações semelhantes. A exposição das células epiteliais à invasão por *P. gingivalis* resultou num aparente arredondamento celular, devido provavelmente à clivagem de caderinas e integrinas pelas *gingipains* da *P. gingivalis*, como relatado por Sheets *et al.* (2005). Estas observações corroboram a noção que a *P. gingivalis* está presente em número reduzido, quando comparado com a microbiota total das bolsas periodontais (Kumar PS, 2006) e que ao permanecer no ambiente intracelular pode multiplicar-se e disseminar-se para células vizinhas (Tribble GD, 2010), obtendo assim não só uma posição privilegiada para modular a resposta imunitária, causando uma ‘disbiose’ entre o hospedeiro e a microbiota subgingival (Darveu RP, 2012), como uma posição que lhe permite escapar aos mecanismos de remoção do hospedeiro e do tratamento periodontal mecânico, perpetuando a cronicidade da doença. Além disso, a existência de células super-invasidas por *P. gingivalis* corrobora a capacidade que as células epiteliais têm de

suportar uma extensa colonização de *P. gingivalis* sem perder a viabilidade devido à indução de mecanismos anti-apoptóticos pela própria *P. gingivalis*, como estratégia de sobrevivência.

Neste estudo não foi possível detetar a presença de *A. actinomycetemcomitans* na placa subgengival das amostras colhidas o que poderá estar relacionado com a ausência do microrganismo na amostra de conveniência, não probabilística, e que foi selecionada apenas com base no julgamento crítico do investigador face à elevada probabilidade de deteção de ambos os microrganismos em indivíduos com periodontite. Não obstante, foi possível observar o *A. actinomycetemcomitans* internalizado nos tecidos periodontais. A ausência de células super-invadidas por *A. actinomycetemcomitans* está de acordo com estudos prévios que sustentam que o *A. actinomycetemcomitans* parece migrar de célula para célula (Meyer DH, 1999), não as sobre colonizando por forma a minimizar a apoptose celular.

A técnica de PNA-FISH mostrou-se capaz de discriminar e localizar patogénicos periodontais no biofilme subgengival e internalizados nos tecidos periodontais. Recorrendo a esta técnica, estudos futuros deverão incidir na identificação de padrões de colonização dos tecidos periodontais em pacientes com diferentes diagnósticos periodontais bem como na identificação de alterações nesses padrões em resposta a diferentes tratamentos de periodontais.

CONCLUSÃO

Esta investigação apresenta um novo método para discriminar e co-localizar *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* em amostras clínicas em apenas algumas horas. Com esta técnica foi possível observar, pela primeira vez, a distribuição espacial simultânea destas espécies em biopsias de tecido gengival pela técnica de FISH. Ao abrir novas perspetivas, esta técnica tem o potencial para esclarecer o papel da invasão bacteriana na etiopatogenia da doença periodontal.

AGRADECIMENTOS

Os autores relatam não haver conflitos de interesse. Este trabalho foi financiado por fundos FEDER através do Programa Operacional Fatores de Competitividade - COMPETE, ON.2 - O Novo Norte - Programa Operacional Regional do Norte de Portugal [NORTE-07-0124-FEDER-000025 - RL2_ Ambiente e Saúde]; e os fundos nacionais através da FCT - Fundação para a Ciência e Tecnologia sob o projeto 'DNA mimics' [Pest-C / EQB / UI0511, PIC / IC / 82815/2007, SFRH / BDE / 51910/2012, SFRH / BD / 82663/2011].

4.

DISCUSSÃO FINAL

| DISCUSSÃO FINAL

A periodontite é uma doença complexa e multifactorial que resulta de um desequilíbrio entre a microbiota subgengival e as defesas do hospedeiro, em indivíduos suscetíveis (Sanz M, 2011), que culmina na perda dentária por falta de suporte periodontal. Os modelos de patogénese periodontal e de colonização, organização e sucessão microbiana no biofilme periodontal e interação deste com o hospedeiro, descritos no capítulo 2, constituem a base da investigação periodontal, que tem avançado timidamente em ciclos de aceitação e rejeição de conceitos ao sabor dos avanços dos métodos de microbiologia, biologia molecular e genética, sem que se produzisse um conhecimento definitivo sobre os fenómenos de iniciação e progressão das doenças periodontais, mais concretamente da periodontite. Esta realidade está bem patente na ausência de grandes mudanças conceptuais no que diz respeito ao diagnóstico e tratamento periodontal, nos últimos 30 anos.

| CONSIDERAÇÕES METODOLÓGICAS

O primeiro estudo desta tese sobre biofilme supra e subgengival é um ensaio clínico randomizado, *crossover*, duplamente cego segundo as *guidelines* do *Consort group* (Schulz KF, 2010). Tem por base a noção de que a organização das bactérias em biofilmes dificulta a resposta do hospedeiro e a ação de agentes antimicrobianos (Mah TF, 2001; Armitage GC, 2009), contribuindo para a perpetuação da doença. Visa, por isso, avaliar clinicamente a eficácia de métodos mecânicos e químicos sobre o biofilme oral, em voluntários saudáveis, com mau hálito matinal. Tipicamente, a investigação do biofilme oral assenta na avaliação qualitativa e quantitativa de putativos patogénicos (Socransky SS, 2005; Colombo AP, 2009; Park OJ, 2015;) ou na avaliação de outros biomarcadores, clínicos ou laboratoriais, (Serrano C, 2011; Colombo AV, 2012; Haas AN, 2012; Rodrigues AS, 2012) usados para determinar um efeito do biofilme ou uma ação sobre ele. Os níveis de CSV no ar exalado estão correlacionados com a intensidade do mau hálito detetado clinicamente (Scully C, 2008) e, por isso, são habitualmente utilizados como indicadores do sucesso das terapias anti-halitose (Fedorowicz Z, 2008; Van der Sleen MI, 2010; Kuo YW, 2013). Por outro lado, são um produto do metabolismo bacteriano, e por isso, podem ser utilizados para inferir o efeito de ações mecânicas e químicas sobre a flora proteolítica gram-negativa da cavidade oral, que engloba vários dos putativos patogénicos periodontais (Kishi M, 2013). Este facto, aliado à possibilidade de conduzir um estudo simples, pouco oneroso, praticamente desprovido de fatores de confundimento e com mínimas implicações éticas, fundamenta a opção por esta primeira investigação acerca do biofilme oral.

Ao contrário do que seria expectável, o primeiro estudo mostrou que a instrumentação mecânica, *per se*, não tinha um impacto significativo na redução de CSV, nem potenciava significativamente a ação dos colutórios com ação antimicrobiana e neutralizante do odor. A ação química de colutórios com formulações complexas parece ser a principal responsável pela redução de CSV produzidos pela flora proteolítica da cavidade oral. Tal como discutido no capítulo 3, estes resultados podem significar que a indução de mau hálito matinal pode não ser o melhor modelo para estudar a influência da disrupção do biofilme. Para além disso, pode ser argumentado que uma amostra maior talvez fosse capaz de detetar diferenças estatisticamente significativas de um efeito de menor dimensão. Contudo, pequenas alterações nos CSV não se revestem de significância clínica no que diz respeito à intensidade do mau hálito e é improvável que traduzam qualquer impacto significativo na flora proteolítica gram-negativa.

A utilização de métodos mecânicos no tratamento e controlo tanto do mau hálito como das doenças periodontais assenta essencialmente em dois pressupostos. O primeiro é o de que são capazes de reduzir a carga bacteriana total e o segundo é que a disrupção do biofilme pode perturbar a organização e sucessão microbiana alterando não só a quantidade de colonizadores tardios (Teles RP, 2006) mas também a interação com o sistema imunitário, em benefício do indivíduo (Wang D, 2006; Roberts HM, 2015). A diminuição da carga microbiana total pode ser associada à variação em determinados parâmetros clínicos ou diretamente quantificada, ainda que, a exemplo da determinação objetiva da redução da quantidade de putativos agentes patogénicos periodontais, possa estar condicionada por vieses relacionados com a amostragem, com a quantificação de células mortas ou com as características das próprias bactérias quando avaliada por métodos moleculares como a PCR-*real time* ou o *DNA-DNA checkerboard* (Jervøe-Storm PM, 2007; Del Peloso Ribeiro E, 2008; Zijng V, 2010b; Diaz PI, 2012; Dahlen G, 2015). A compreensão definitiva das patologias associadas ao biofilme do ponto de vista etiológico e estabelecimento de terapias mais eficazes parece assim passar pela visualização *in situ* dos fenómenos de organização, sucessão, invasão e interação com o hospedeiro.

A utilização de sondas de PNA na deteção e localização microbiana pela técnica de FISH constituiu uma recente inovação com aplicações importantes na área da saúde (Cerqueira L, 2013; Machado A, 2015; Kim HJ, 2015; Rabensteiner J, 2015). Desde já por permitir uma deteção e localização altamente sensível e específica de microrganismos viáveis de uma forma rápida e com boa relação custo-benefício. Para além disso, o método é fácil de implementar num laboratório convencional, não necessitando de equipamentos específicos, além do microscópio de epifluorescência (Stender H, 2003). No estudo 3 pretendeu-se desenvolver sondas de PNA para dois dos mais relevantes putativos patogénicos periodontais, *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*, passíveis

de utilização em formato *multiplex* e a otimização da técnica para detecção em amostras de placa subgengival e de tecido gengival. Ambas as sondas de PNA apresentam uma sensibilidade e especificidade teórica muito superior às suas homólogas de DNA utilizadas em estudos prévios. Além disso, a otimização do processo laboratorial possibilitou a definição de condições que permitiram a hibridação simultânea de cada sonda com o seu alvo, cortando a metade o tempo laboratorial e os consumos. A aplicação das sondas a uma amostra de conveniência de pacientes com periodontite permitiu confirmar a sua aplicabilidade a amostras de placa subgengival e biópsias de tecido gengival. Não foi possível detetar a presença de *A. actinomycetemcomitans* na placa subgengival das amostras colhidas o que poderá estar relacionado com a ausência do microrganismo na amostra de conveniência, tal como discutido no estudo 3.

Uma das vantagens da técnica de PNA-FISH é poder ser aplicada no estudo da invasão dos tecidos periodontais por putativos patogénicos periodontais. E o interesse da sua aplicação no estudo deste fenómeno intensificou-se após se constatar, no estudo 2, a enorme lacuna que existe entre a dedução teórica sobre a relevância da invasão na etiopatogénese da doença periodontal e a existência de evidência científica que suporte essa dedução. De facto, existem poucos estudos sobre invasão, a maior parte apresentando importantes limitações como ausência de grupo controlo ou de critérios de inclusão e exclusão claros, resultando na inclusão de apenas 3 estudos na revisão sistemática sobre o tema. O desenho caso-controlo (observacional) de todos os estudos incluídos, o reduzido número de estudos, os dados imprecisos ou escassos determinaram o perfil de muito baixa qualidade de evidência da relação entre invasão do periodonto e a doença periodontal.

| CONSIDERAÇÕES MICROBIOLÓGICAS

As sondas de PNA desenvolvidas permitem, pela técnica de PNA-FISH, nas condições definidas a identificação de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*, em amostras clínicas. Apesar da visualização tridimensional da placa subgengival não ser um dos objetivos do trabalho foi interessante notar a organização da *P. gingivalis* em microcolónias, corroborando as observações de vários autores (Noiri Y, 1997 e 2001; Zijnge V, 2010a). De facto, esta organização em microcolónias na camada mais superficial do biofilme subgengival tem sugerido uma distinção entre espécies bacterianas estruturais do biofilme e espécies transientes que colonizam um biofilme já estabelecido (Zijnge V, 2010a) e que podem ser importantes na transição saúde-doença. Porém, as mais-valias desta técnica não assentam só na capacidade de detetar e localizar as bactérias alvo. O recurso à técnica de PNA-FISH permite aferir a viabilidade das bactérias no momento da colheita, com importantes implicações clínicas e de decisão terapêutica, ultrapassando as técnicas de imunohistoquímica, PCR e *DNA-DNA checkerboard*.

Além disso, uma das principais motivações para o desenvolvimento de sondas de PNA residiu no reconhecimento da sua robustez e potencialidades comparativamente às sondas de DNA (Cerqueira L, 2008), fundamentando a expectativa de que seriam capazes de hibridar com as bactérias internalizadas nos tecidos periodontais. Tanto quanto foi possível apurar em pesquisa bibliográfica, não existem estudos que documentem a detecção de invasão bacteriana do epitélio ou tecido conjuntivo pela técnica de DNA-FISH em biópsias de tecidos gengivais. Está apenas documentada a invasão celular, em raspados celulares da mucosa oral e da parte interna do epitélio da bolsa periodontal e do sulco gengival, pela técnica de DNA-FISH (Colombo AV, 2007). Embora demonstrem que as bactérias são capazes de efetuar invasão celular na presença de um sistema imunitário hostil, corroborando estudos *in vitro*, apenas demonstram invasão à superfície dos tecidos, o que talvez justifique a ausência de diferenças significativas entre saúde e doença. Assim sendo, e pela primeira vez, foi possível observar a presença de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* viáveis, pela técnica de FISH, internalizados profundamente nos tecidos, confirmando que possuem a maquinaria necessária para ultrapassar e iludir as defesas do hospedeiro e permanecer num ambiente nutricionalmente favorável.

| CONSIDERAÇÕES CLÍNICAS

Apesar dos esforços das últimas décadas na clarificação da etiopatogénese das doenças periodontais, não é possível estabelecer (ainda) um diagnóstico periodontal baseado em perfis microbiológicos (Mombelli A, 2002) nem traçar um plano de tratamento em função da presença ou ausência de determinado patogénico periodontal (Heitz-Mayfield LJA, 2013), ainda que persistam esforços nesse sentido (Colombo AP, 2009 e 2012; Hong BY, 2015). Não obstante, o uso de agentes antimicrobianos locais e sistémicos parece ter um impacto positivo no tratamento das doenças associadas à placa bacteriana (Fedorowicz Z, 2008; Sanz M, 2008, Smiley CJ, 2015). Visam a eliminação bacteriana ajudando o sistema imunitário na resposta ao desafio microbiano, sendo particularmente úteis em locais inacessíveis aos métodos mecânicos convencionais (Mombelli A, 2000). Este facto é corroborado pelos resultados do estudo 1 que apontam o uso de colutórios antissépticos como um pilar fundamental na redução de CSV produzidos pela flora proteolítica gram-negativa. Ambas as formulações testadas mostraram bons resultados e deverão ser consideradas na terapia anti-halitose.

No caso da periodontite, a capacidade de internalização das bactérias nos tecidos faz com que exista uma enorme área inacessível. Tal como discutido no capítulo 2, as bactérias internalizadas poderão exercer não só uma ação tóxica direta sobre os

tecidos como poderão usar esta capacidade para resistir à eliminação pelos métodos mecânicos convencionais, agravando e/ou perpetuando a doença periodontal (Lamont RJ, 2000). Este facto poderá ajudar a explicar os resultados positivos observados na associação de antibioterapia sistémica ao tratamento periodontal convencional (Keestra JAJ, 2014 e 2015). Contudo, Johnson *et al.* (2008) observou a persistência de bactérias intracelulares em raspados da mucosa oral de pacientes com periodontite agressiva após antibioterapia. Mais uma vez, a observação de células descamadas à superfície da mucosa oral poderá não traduzir adequadamente o impacto da antibioterapia sistémica nos tecidos periodontais. Por outro lado, a internalização celular poderá permitir às bactérias resistir à antibioterapia sistémica (Eick S, 2004). Se se vier a demonstrar que a invasão dos tecidos periodontais é, de facto, um mecanismo chave na etiopatogénese das doenças periodontais será de suma importância a seleção de antibióticos que demonstrem eficácia na eliminação das bactérias internalizadas como coadjuvantes no tratamento periodontal. As características, já exploradas extensamente no capítulo 3, das sondas de PNA desenvolvidas poderão não só ajudar a clarificar o papel da invasão da *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* na etiopatogénese da periodontite como ajudar a mensurar o efeito da antibioterapia sistémica nas bactérias internalizadas, contribuindo para o seu uso racional. De facto, a rapidez e a boa relação de custo-benefício associada à técnica de PNA-FISH tem potencial para acompanhar a tendência atual de medicina personalizada permitindo, não só a identificação de situações clínicas passíveis de tratamento com antimicrobianos como o estabelecimento de antibioterapia direcionada ao microrganismo alvo ou ao consórcio microbiano, sendo inclusivé possível o desenho de sondas que permitam a discriminação de microrganismos sensíveis e resistentes a determinado antimicrobiano (Cerqueira L, 2013).

5.

CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

| CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

Em suma, o estudo do biofilme oral ao longo deste programa doutoral permitiu mostrar que os métodos mecânicos de higiene oral não parecem ter um impacto significativo sobre a flora proteolítica gram-negativa produtora de CSV, nem potenciar a ação, por si só significativa, de associações de CHX-CPC-ZN e CHX-triclosan-ZN, veiculadas em colutórios orais, na redução de CSV. Adicionalmente, demonstrou-se a inexistência de evidência científica que suporte o conceito de que a invasão bacteriana dos tecidos periodontais tem um papel relevante na etiopatogenia das doenças periodontais. Estes achados motivaram o desenvolvimento e otimização de sondas de PNA para a identificação e localização simultânea de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*, com as quais foi possível observar, pela primeira vez pela técnica de FISH, que ambas as bactérias parecem ser capazes de invadir profundamente os tecidos gengivais e permanecerem viáveis numa localização intragengival.

Para clarificar a organização e sucessão microbiana no biofilme periodontal e a sua interação com o hospedeiro, bem como a resposta às intervenções mecânicas e químicas, mais estudos são necessários, para os quais apresentamos uma técnica molecular com grandes potencialidades. Mais concretamente, a aplicação das sondas desenvolvidas poderá clarificar tanto o papel da *P. gingivalis* enquanto patogénico-chave na iniciação e progressão da periodontite, pelas suas características invasoras e de modulação do sistema imunitário, como o papel da invasão do leucotóxico *A. actinomycetemcomitans*, particularmente na periodontite agressiva, num grande estudo comparativo entre saúde e doença. Ademais, poderão ser uma mais-valia na visualização do impacto da terapia periodontal mecânica convencional com ou sem antibioterapia sistémica no biofilme supra e subgengival, bem como nas bactérias internalizadas nos tecidos periodontais, como parte das observações colhidas em ensaios clínicos randomizados em pacientes com periodontite crónica e agressiva. Estes estudos poderão ser enriquecidos com o desenho de sondas para outros conhecidos putativos patogénicos periodontais através da técnica de CLASI-FISH aumentando exponencialmente a capacidade de discriminação bacteriana, num único campo de visão.

| BIBLIOGRAFIA

Al-Ahmad A, Wunder A, Auschill TM, Follo M, Braun G, Hellwig E, Arweiler NB. The *in vivo* dynamics of *Streptococcus spp.*, *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella spp.* in dental plaque biofilm as analysed by five-colour multiplex fluorescence *in situ* hybridization. *J Med Microbiol* 2007; 56: 681-687.

Allenspach-Petrzilka GE, Guggenheim B. Bacterial invasion of the periodontium: an important factor in the pathogenesis of periodontitis?. *J Clin Periodontol* 1983; 10(6):609-617.

Almeida C, Azevedo NF, Fernandes RM, Keevil CW, Vieira MJ. Fluorescence *in situ* hybridization method using a peptide nucleic acid probe for identification of *Salmonella* spp. in a broad spectrum of samples. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76:4476-4485.

Almeida C, Azevedo NF, Santos S, Keevil CW, Vieira MJ. Discriminating Multi-Species Populations in Biofilms with Peptide Nucleic Acid Fluorescence *In Situ* Hybridization (PNA FISH). *PLoS ONE* 2011; 6(3): e14786.

Alves CT, Wei XQ, Silva S, Azeredo J, Henriques M, Williams DW. *Candida albicans* promotes invasion and colonisation of *Candida glabrata* in a reconstituted human vaginal epithelium. *J Infect* 2014; 69:396-407.

Amann R, Fuchs BM. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6:339-348.

Amano A, Nakagawa I, Okahashi N, Hamada N. Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *J Periodontal Res* 2004; 39: 136-142.

Armitage GC, Robertson PB. The biology, prevention, diagnosis and treatment of periodontal diseases: scientific advances in the United States. *J Am Dent Assoc* 2009; 140(Suppl. 1): 36S-43S.

Armitage GC. Classifying periodontal diseases – a long standing dilemma. *Periodontol 2000* 2002; 30: 9-23.

Armitage GC. Learned and unlearned concepts in periodontal diagnostics: a 50-year perspective. *Periodontol 2000* 2013; 62:20-36.

Armitage GC. Periodontal diagnosis and classification. *Periodontol 2000* 2004a; 34: 9-21.

Armitage GC. The complete periodontal examination. *Periodontol 2000* 2004b; 34: 22-33.

Arndt A, Davey ME. *Porphyromonas gingivalis*: surface polysaccharides as virulence determinants. In: Sasano O, Suzuki T. *Interface Oral Health Science* 2009. Tokyo: Springer, 2010:382-387.

Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1996; 11:266-273.

Atkins D, Best D, Briss PA, Eccles M, Falck-Ytter Y, Flottorp S, Guyatt GH, Harbour RT, Haugh MC, Henry D, Hill S, Jaeschke R, Leng G, Liberati A, Magrini N, Mason J, Middleton P, Mrukowicz J, O'Connell D, Oxman AD, Phillips B, Schünemann HJ, Edejer T, Varonen H, Vist GE, Williams JW Jr, Zaza S; GRADE Working Group. Grading quality of evidence and strength of recommendations. *BMJ* 2004; 328:1490.

Bai A, Shukla VK, Bak G, Wells G. *Quality assessment tools project report*. Ottawa: canadian agency for drugs and technologies in health; 2012.

Bartold PM, Van Dyke, TE. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts. *Periodontol 2000* 2013; 62:203-217.

Belton CM, Izutsu KT, Goodwin PC, Park Y, Lamont RJ. Fluorescence image analysis of the association between *Porphyromonas gingivalis* and gingival epithelial cells. *Cell Microbiol* 1999; 1: 215-223.

Berlier JE, Rothe A, Buller G, Bradford J, Gray DR, Filanoski BJ, Telford WG, Yue S, Liu J, Cheung CY, Chang W, Hirsch JD, Beechem JM, Haugland RP, Haugland RP. Quantitative comparison of long-wavelength Alexa Fluor dyes to Cy dyes: Fluorescence of the dyes and their bioconjugates. *J Histochem Cytochem* 2003; 51:1699-1712.

Besouw M, Blom H, Tangerman A, de Graaf-Hess A, Levtschenko E. The origin of halitosis in cystinotic patients due to cysteamine treatment. *Mol Genet Metab* 2007; 91:228-233.

Bittar F, Richet H, Dubus JC, Reynaud-Gaubert M, Stremier N, Sarles J, Raoult D, Rolain JM. Molecular detection of multiple emerging pathogens in sputa from cystic fibrosis patients. *PLoS One* 2008; 3:e2908.

Blom T, Slot D, Quirynen M, Van der Weijden G. The effect of mouthrinses on oral malodor: a systematic review. *Int J Dent Hyg* 2012; 10:209-22.

Bosshardt DD, Lang NP. The junctional epithelium: from health to disease. *J Dent Res* 2005; 84:9-20.

Bostanci N, Belibasakis GN. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiol Lett* 2012; 333:1-9.

Bosy A, Kulkarni GV, Rosenberg M, McCulloch CA. Relationship of oral malodor to periodontitis: evidence of independence in discrete subpopulations. *J Periodontol* 1994; 65:37-46.

Boulware RT, Southard GL. Sanguinarine in the control of volatile sulfur compounds in the mouth: a comparative study. *Compend Contin Educ Dent* 1984; 5: 61-64.

Brígido JA, da Silveira VRS, Rego RO, Nogueira NAP. Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in relation to periodontal status and geographic origin of individuals-a review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2014; 19:e184-191.

Burt B. Position paper: epidemiology of periodontal diseases. *J Periodontol* 2005; 76: 1406-1419.

Carlisle MD, Srikantha RN, Brogden KA. Degradation of human alpha- and beta-defensins by culture supernatants of *Porphyromonas gingivalis* strain 381. *J Innate Immun* 2009; 1: 118- 122.

Carvalho MD, Tabchoury CM, Cury JA, Toledo S, Nogueira-Filho GR. Impact of mouthrinses on morning bad breath in healthy subjects. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 85-90.

Cerqueira L, Azevedo NF, Almeida C, Jardim T, Keevil CW, Vieira MJ. DNA mimics for the rapid identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Int. J. Mol Sci* 2008; 9: 1944-1944.

Cerqueira L, Fernandes RM, Ferreira RM, Carneiro F, Dinis-Ribeiro M, Figueiredo C, Keevil CW, Azevedo NF, Vieira MJ. PNA-FISH as a new diagnostic method for the determination of clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori*. *BMC Microbiol* 2011; 11:101.

Cerqueira L, Fernandes RM, Ferreira RM, Oleastro M, Carneiro F, Brandão C, Pimentel-Nunes P, Dinis-Ribeiro M, Figueiredo C, Keevil CW, Vieira MJ, Azevedo NF. Validation of a fluorescence

in situ hybridization method using peptide nucleic acid probes for detection of *Helicobacter pylori* clarithromycin resistance in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 2013; 51:1887-1893.

Christersson LA, Wikesjö UM, Albin B, Zambón JJ, Genco RJ. Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. II. Correlation between immunofluorescence and culture techniques. *J Periodontol* 1987; 58: 540 – 545.

Cohen J. A power primer. *Psychol Bull* 1992; 112:155-159.

Colombo AP, Bennet S, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, Socransky SS, Hasturk H, Van Dyke TE, Dewhirst FE, Paster BJ. Impact of periodontal therapy on the subgingival microbiota of severe periodontitis: comparison between good responders and individuals with refractory periodontitis using the human oral microbe identification microarray. *J Periodontol* 2012; 83:1279-87.

Colombo AP, Boches SK, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, Socransky SS, Hasturk H, Van Dyke TE, Dewhirst F, Paster BJ. Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. *J Periodontol* 2009; 80:1421-1432.

Colombo AV, Barbosa GM, Higashi D, di Micheli G, Rodrigues PH, Simionato MR. Quantitative detection of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* in human oral epithelial cells from subjects with periodontitis and periodontal health. *J Med Microbiol* 2013; 62(Pt 10):1592-600.

Colombo AV, da Silva CM, Haffajee A, Colombo APV. Identification of intracellular oral species within human crevicular epithelial cells from subjects with chronic periodontitis by fluorescence *in situ* hybridization. *J Periodont Res* 2007; 42: 236– 243.

Colombo AV, da Silva CM, Haffajee A, Colombo APV. Identification of oral bacteria associated with crevicular epithelial cells from chronic periodontitis lesions. *J Med Microbiol* 2006; 55(pt 5): 609 – 615.

Curtis MA, Kuramitsu HK, Lantz M, Macrina FL, Nakayama K, Potempa J, Reynolds EC, Aduse-Opoku J. Molecular genetics and nomenclature of proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol Res* 1999; 34: 464 – 472.

Dahlen G, Preus HR, Baelum V. Methodological issues in the quantification of subgingival microorganisms using the checkerboard technique. *J Microbiol Methods* 2015; 110:68-77.

Danser MM, Gómez SM, Van der Weijden GA. Tongue coating and tongue brushing: a literature review. *Int J Dent Hyg*. 2003; 1:151-158.

Darveau RP, Belton CM, Reife RA, Lamont RJ. Local chemokine paralysis, a novel pathogenic mechanism for *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 1998; 66: 1660-1665.

Darveau RP, Pham TT, Lemley K, Reife RA, Bainbridge BW, Coats SR, Howald WN, Way SS, Hajjar AM. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infect Immun* 2004; 72: 5041-5051.

Darveau RP, Hajishengallis G, Curtis MA. *Porphyromonas gingivalis* as a potential community activist for disease. *J Dent Res* 2012; 91:816-820.

Del Peloso Ribeiro E, Bittencourt S, Sallum EA, Nociti FH Jr, Gonçalves RB, Casati MZ. Periodontal debridement as a therapeutic approach for severe chronic periodontitis: a clinical, microbiological and immunological study. *J Clin Periodontol* 2008; 35:789-798.

Delacourt-Debruyne EM, Boutigny HR, Hildebrand HF. Features of severe periodontal disease in a teenager with Chédiak-Higashi syndrome. *J Periodontol* 2000; 71: 816-824.

Delanghe G, Ghyselen J, Bollen C, van Steenberghe D, Vandekerckhove BN, Feenstra L. An inventory of patients' response to treatment at a multidisciplinary breath odor clinic. *Quintessence Int* 1999; 30: 307-310.

Delanghe G, Ghyselen J, Van Steenberghe D, Feenstra L. Multidisciplinary breath-odour clinic. *Lancet* 1997; 350: 187.

Delong EF, Wickham GS, Pace NR. Phylogenetic stains – Ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* 1989; 243:1360-1363.

Deporter DA, Ten Cate AR. Collagen resorption by periodontal ligament fibroblasts at the hard tissue-ligament interfaces of the mouse molar *periodontium*. *J Periodontol* 1980; 51: 429-432.

Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, Lakshmanan A, Wade WG. The human oral microbiome. *J Bacteriol* 2010; 192: 5002-5017.

Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ Jr, Kolenbrander PE. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 2837-2842.

Diaz PI, Dupuy AK, Abusleme L, Reese B, Obergfell C, Choquette L, Dongari-Bagtzoglou A, Peterson DE, Terzi E, Strausbaugh LD. Using high throughput sequencing to explore the biodiversity in oral bacterial communities. *Mol Oral Microbiol* 2012; 27: 182-201.

Dibart S, Skobe Z, Snapp KR, Socransky SS, Smith CM, Kent R. Identification of bacterial species on or in crevicular epithelial cells from healthy and periodontally diseased patients using DNA-DNA hybridization. *Oral Microbiol Immunol* 1998; 13: 30 - 35.

Dickersin K. Systematic reviews in epidemiology: why we are so far behind? *Inter J Epidemiol* 2002; 31: 6 -12.

Dickinson BC, Moffatt CE, Hagerty D. Interaction of oral bacteria with gingival epithelial cell multilayers. *Mol Oral Microbiol* 2011; 26: 210 – 220.

Ding Y, Haapasalo M, Kerosuo E, Lounatmaa K, Kotiranta A, Sorsa T. Release and activation of human neutrophil matrix metallo and serine proteinases during phagocytosis of *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola*. *J Clin Periodontol* 1997; 24:237-248.

Dorn BR, Leung KL, Progulske-Fox A. Invasion of human oral epithelial cells by *Prevotella intermedia*. *Infect Immun* 1998; 66: 6054 - 6057.

Doungudomdacha S, Rawlinson A, Douglas CW. Enumeration of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque samples by a quantitative-competitive PCR method. *J Med Microbiol* 2000 49: 861-874.

Downs SH, Black N. The feasibility of creating a checklist for the assessment of the methodological quality both of randomised and non-randomised studies of health care interventions. *J Epidemiol Community Health* 1998; 52:377-384.

Drobniewski FA, More PG, Harris GS. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacterial liquid cultures by using peptide nucleic acid fluorescence *in situ* hybridization probes. *J Clin Microbiol* 2000; 38:444-447.

Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1988; 15: 316–323.

Eick S, Pfister W. Efficacy of antibiotics against periodontopathogenic bacteria within epithelial cells: an *in vitro* study. *J Periodontol* 2004; 75: 1327–1334.

Evian CI, Rosenberg ES, Listgarten MA. Bacterial variability within diseased periodontal sites. *J Periodontol* 1982; 53: 595–598.

Farrell S, Baker RA, Somogyi-Mann M, Witt JJ, Gerlach RW. Oral malodor reduction by a combination of chemotherapeutical and mechanical treatments. *Clin Oral Investig* 2006; 10: 157–163

Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Method* 2007; 39:175–191.

Faveri M, Hayacibara MF, Pupio GC, Cury JA, Tsuzuki CO, Hayacibara RM. A cross-over study on the effect of various therapeutic approaches to morning breath odour. *J Clin Periodontol* 2006; 33: 555–560.

Fedorowicz Z, Aljufairi H, Nasser M, Outhouse TL, Pedrazzi V. Mouthrinses for the treatment of halitosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; 8:CD006701.

Fernandez y Mostajo M, Zaura E, Crielaard W, Beertsen W. Does routine analysis of subgingival microbiota in periodontitis contribute to patient benefit? *Eur J Oral Sci* 2011; 119: 259–264.

Fives-Taylor P, Meyer D, Mintz K. Characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* invasion of and adhesion to cultured epithelial cells. *Adv Dent Res* 1995; 9:55 – 62.

Fletcher J, Nair S, Poole S, Henderson B, Wilson M. Cytokine degradation by biofilms of *Porphyromonas gingivalis*. *Curr Microbiol* 1998; 36: 216–219.

Fontenete S, Barros J, Madureira P, Figueiredo C, Wengel J, Azevedo NF. Mismatch discrimination in fluorescent *in situ* hybridization using different types of nucleic acids. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015; 99:3961–3969.

Forrest GN. PNA FISH: Present and future impact on patient management. *Expert Rev Mol Diagn* 2007; 7:231–236.

Fournier D, Mouton C, Lapierre P, Kato T, Okuda K, Ménard C. *Porphyromonas gulae* sp. nov., an anaerobic, gram-negative coccobacillus from the gingival sulcus of various animal hosts. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51:1179–1189.

Fuchs BM, Wallner G, Beisker W, Schwiippl I, Ludwig W, Amann R. Flow Cytometric Analysis of the *In Situ* Accessibility of Escherichia coli 16S rRNA for Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:4973–4982.

Gaetti-Jardim E Jr, Pereira MF, Vieira EM, Schweitzer CM, Okamoto AC, Ávila-Campos MJ. Occurrence of periodontal pathogens in ethnic groups from a native Brazilian reservation. *Arch Oral Biol* 2015; 60:959–665.

Garcia L, Tercero JC, Legido B, Ramos JA, Alemany J, Sanz M. Rapid detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, and *Porphyromona gingivalis* by multiplex PCR. *J Periodont Res* 1998; 33:59–64.

Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity. *Periodontol 2000* 2007; 43: 14 - 40.

Genco RJ, Slots J. Host responses in periodontal diseases. *J Dent Res* 1984; 63: 441-454.

Gersdorf H, Meissner A, Pelz K, Krekeler G, Goel UB. Identification of *Bacteroides forsythus* in subgingival plaque from patients with advanced periodontitis. *J Clin Microbiol* 1993; 3: 941-946.

Gmur R, Strub JK, Guggenheim B. Prevalence of *Bacteroides forsythus* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival plaque of prosthodontically treated patients on short recall. *J Periodontal Res* 1989; 24: 113-120.

Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 335- 351.

Guimarães N, Azevedo NF, Figueiredo C, Keevil CW, Vieira MJ. Development and application of a novel peptide nucleic acid probe for the specific detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 2007; 45:3089-3094.

Guyodo H, Meuric V, Le Pottier L, Martin B, Pers JO, Bonnaure-Mallet M. Colocalization of *Porphyromonas gingivalis* with CD4+ T cells in periodontal disease. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012; 64:175-83.

Haas AN, Silva-Boghossian CM, Colombo AP, Susin C, Albandar JM, Oppermann RV, Rösing CK. Adjunctive azithromycin in the treatment of aggressive periodontitis: microbiological findings of a 12-month randomized clinical trial. *J Dent* 2012; 40:556-563.

Haffajee AD, Dzink JL, Socransky SS. Effect of modified widman flap surgery and systemic tetracycline on the subgingival microbiota of periodontal lesions. *J Clin Periodontol* 1988; 15: 255-262.

Haffajee AD, Patel M, Socransky SS. Microbiological changes associated with four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2008; 23:148-157.

Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol* 2008; 23:196-205.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* 1994; 5:78-111.

Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Molecular Oral Microbiol* 2012; 27: 409-419.

Hajishengallis G, Shakhatreh MA, Wang M, Liang S. Complement receptor 3 blockade promotes IL-12-mediated clearance of *Porphyromonas gingivalis* and negates its virulence in vivo. *J Immunol* 2007; 179: 2359-2367.

Hajishengallis G, Wang M, Liang S. Induction of distinct TLR2-mediated proinflammatory and proadhesive signaling pathways in response to *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *J Immunol* 2009; 182: 6690-6696.

Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, Hashim A, Jotwani R, Eskin MA, McIntosh ML, Alsam A, Kirkwood KL, Lambris JD, Darveau RP, Curtis MA. Low-abundance biofilm species orchestrates

inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe* 2011; 10:497-506.

Harvey ARC, Champe PC, Fisher BD. Microbiology. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 19-31.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6:986-94.

Heitz-Mayfield LJA, Lang NP. Surgical and nonsurgical periodontal therapy. Learned and unlearned concepts. *Periodontol 2000* 2013; 62: 218-231.

Herrera D, Roldán S, González I, Sanz M. The periodontal abscess (I). Clinical and microbiological findings. *J Clin Periodontol* 2000; 27:387-94.

Higgins JPT, Green S. Cochrane handbook for systematic reviews of interventions. The cochrane collaboration, 2011; v.5.0.2. Available at <http://www.cochrane-handbook.org>. Accessed Dez 1, 2013.

Hillmann G, Dogan S, Geurtsen W. Histopathological investigation of gingival tissue from patients with rapidly progressive periodontitis. *J Periodontol* 1998; 69:195-208.

Hong BY, Furtado Araujo MV, Strausbaugh LD, Terzi E, Ioannidou E, Diaz PI. Microbiome profiles in periodontitis in relation to host and disease characteristics. *PLoS One* 2015; 10:e0127077.

Huang GT, Haake SK, Kim JW, Park N. Differential expression of interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* or *Porphyromonas gingivalis* infection. *Oral Microbiol Immunol* 1998; 13: 301-309.

Hugoson A, Norderyd O. Has the prevalence of periodontitis changed during the last 30 years? *J Clin Periodontol* 2008; 35: 338-345.

Hunt DE, Jones JV, Dowell VR Jr. Selective medium for the Isolation of *Bacteroides gingivalis*. *J Clin Microbiol* 1986; 23:441-445.

Hyrup B, Nielsen PE. Peptide nucleic acids (PNA): synthesis, properties and potential applications. *Bioorg Med Chem* 1996; 4:5-23.

Ishizuka M. [Identification of periodontopathic bacteria DNA from periodontitis-involved gingival tissue using a PCR method]. *Kokubyo Gakkai Zasshi* 2002; 69:15-26.

Jervøe-Storm PM, AlAhdab H, Semaan E, Fimmers R, Jepsen S. Microbiological outcomes of quadrant versus full-mouth root planing as monitored by real-time PCR. *J Clin Periodontol* 2007; 34:156-163.

Johnson G, Millar MR, Matthews S, Skyrme M, Marsh P, Barringer E, O'Hara S, Wilks M. Evaluation of BacLite Rapid MRSA, a rapid culture based screening test for the detection of ciprofloxacin and methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) from screening swabs. *BMC Microbiol* 2006; 6:83.

Johnson JD, Chen R, Lenton PA, Zhang G, Hinrichs JE, Rudney JD. Persistence of extracrevicular bacterial reservoirs after treatment of aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2008; 79: 2305-2312.

Kawada M, Yoshida A, Suzuki N, Nakano Y, Saito T, Oho T, Koga T. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* in relation to periodontal status assessed by real-time PCR. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 289-292.

Keestra JAJ, Grosjean I, Coucke W, Quirynen M, Teughels W. Non-surgical periodontal therapy with systemic antibiotics in untreated aggressive periodontitis patients: a systematic review and meta-analysis. *J Periodont Res* 2014; 18. doi: 10.1111/jre.12252. [Epub ahead of print]

Keestra JAJ, Grosjean I, Coucke W, Quirynen M, Teughels W. Non-surgical periodontal therapy with systemic antibiotics in patients with untreated chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodont Res* 2015; 50:294-314.

Kim HJ, Brehm-Stecher BF. Design and evaluation of peptide nucleic acid probes for specific identification of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 2015; 53:511-521.

Kim YC, Ko Y, Hong SD, Kim KY, Lee YH, Chae C, Choi Y. Presence of *Porphyromonas gingivalis* and plasma cell dominance in gingival tissues with periodontitis. *Oral Dis* 2010; 16: 375-381.

Kishi M, Ohara-Nemoto Y, Takahashi M, Kishi K, Kimura S, Aizawa F, Yonemitsu M. Prediction of periodontopathic bacteria in dental plaque of periodontal healthy subjects by measurement of volatile sulfur compounds in mouth air. *Arch Oral Biol* 2013; 58:324-330.

Kleinberg I, Wolff MS, Codipilly DM. Role of saliva in oral dryness, oral feel and oral malodour. *Int Dent J* 2002; 52: 236-240.

Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000* 2006; 42:47-79.

Kornman KS. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol* 2008; 79(Suppl): 1560-1568.

Kroes I, Lepp PW, Relman DA. Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14547-14552.

Kubar A, Saygun I, Özdemir A, Yapar M, Slot J. Real-time polymerase chain reaction quantification of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in periodontal pockets and the adjacent gingiva of periodontitis lesions. *J Periodontal Res* 2005; 40:97-104

Kumar PS, Leys EJ, Bryk JM, Martinez FJ, Moeschberger ML, Griffen AL. Changes in periodontal health status are associated with bacterial community shifts as assessed by quantitative 16S cloning and sequencing. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3665-3673.

Kuo YW, Yen M, Fetzer S, Lee JD. Toothbrushing versus toothbrushing plus tongue cleaning in reducing halitosis and tongue coating: a systematic review and meta-analysis. *Nurs Res* 2013; 62:422-429.

Kurital Ochiai T, Ochiai K, Ikeda T. Immunosuppressive effects induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: Effect on immunoglobulin production and lymphokine synthesis. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7: 338-43.

Lamont RJ, Chan A, Belton CM, Izutsu KT, Vasel D, Weinberg A. *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun* 1995; 63: 3878- 3885.

Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line. Pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 1244-1263.

Lamont RJ, Yilmaz O. In or out: the invasiveness of oral bacteria. *Periodontol 2000* 2002; 30: 61-69.

Lillo A, Booth V, Kyriacou L, Weightman AJ, Wade WG. Culture-independent identification of periodontitis-associated *Porphyromonas* and *Tannerella* populations by targeted molecular analysis. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 5523-5527.

Listgarten MA. Electron microscopic observations on the bacterial flora of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J Periodontol* 1965; 36: 328-339.

- Listgarten MA.** Pathogenesis of periodontitis. *J Clin Periodontol* 1986; 13:418-430.
- Loe H, Theilade E, Jensen SB.** Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 1965; 36: 177-187.
- Loesche WJ, Kazor C.** Microbiology and treatment of halitosis. *Periodontol 2000* 2002; 28: 256-279.
- Lotufo RF, Flynn J, Chen C, Slots J.** Molecular detection of *Bacteroides forsythus* in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1994; 9: 154-160.
- Lyons SR, Griffen AL, Leys EJ.** Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2362-2365.
- Machado A, Castro J, Cereija T, Almeida C, Cerca N.** Diagnosis of bacterial vaginosis by a new multiplex peptide nucleic acid fluorescence *in situ* hybridization method. *PeerJ* 2015; 3:e780.
- Madianos PN, Papapanou PN, Sandros J.** *Porphyromonas gingivalis* infection of oral epithelium inhibits neutrophil transepithelial migration. *Infect Immun* 1997; 65: 3983 - 3990.
- Mager DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS.** Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 644 - 654.
- Mah TF, O'Toole GA.** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001; 9:34-39.
- Manor A, Lebendiger M, Shiffer A, Tovel H.** Bacterial invasion of periodontal tissues in advanced periodontitis in humans. *J Periodontol* 1984; 55: 567 - 573.
- Marsh PD, Devine DA.** How is the development of dental biofilms influenced by the host? *J Clin Periodontol* 2011; 38 (Suppl. 11): 28-35.
- Marsh PD.** Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994; 8:263-271.
- Marshall JS, Haskard DO.** Clinical overview of leucocyte adhesion and migration: where are we now? *Semin Immunol* 2002; 14:133-140.
- McClellan DL, Griffen AL, Leys EJ.** Age and prevalence of *Porphyromonas gingivalis* in children. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2017-2019.
- Mendes L, Azevedo NF, Pinto MG.** Relationship between invasion of the *periodontium* by periodontal pathogens and periodontal disease: a systematic review. *Virulence* 2015; 6: 208-215.
- Meurman JH, Wahlfors J, Korhonen A, Alakuijala P, Vaisanen P, Torkko H, Janne J.** Identification of *Bacteroides forsythus* in subgingival dental plaque with the aid of a rapid PCR method. *J Dent Res* 1997; 76: 1376-1380.
- Meyer DH, Lippmann JE, Fives-Taylor PM.** Invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a dynamic, multistep process. *Infect Immun* 1996; 64: 2988-2997.
- Meyer DH, Rose JE, Lippmann JE, Fives-Taylor PM.** Microtubules are associated with intracellular movement and spread of the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 1999; 67: 6518-6525.
- Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, PRISMA Group.** Preferred reporting items for systematic reviews and meta analyses: the PRISMA statement. *Open Med* 2009; 3: 123 -130.

- Mombelli A, Casagni F, Madianos PN.** Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J Clin Periodontol* 2002; 29 (suppl 3):10 – 21.
- Mombelli A, Schmid B, Rutar A, Lang NP.** Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. *J Periodontol* 2000; 71:14–21.
- Monis PT, Giglio S.** Nucleic acid amplification-based techniques for pathogen detection and identification. *Infect Genet Evol* 2006; 6:2-12.
- Mooney A, Byrne C, Clyne M, Johnson-Henry K, Sherman P, Bourke B.** Invasion of human epithelial cells by *Campylobacter upsaliensis*. *Cell Microbiol* 2003; 5: 835 – 847.
- Moore LVH, Moore WEC, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA, Best AM, Ranney RR.** Bacteriology of human gingivitis. *J Dent Res* 1987; 66: 989–995.
- Moore WEC, Moore LH.** The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000* 1994; 5: 66–77.
- Moran J, Addy M, Newcombe R.** A 4-day plaque regrowth study comparing an essential oil mouthrinse with a triclosan mouthrinse. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 636-639.
- Moshkowitz M, Horowitz N, Leshno M, Halpern Z.** Halitosis and gastroesophageal reflux disease: a possible association. *Oral Dis* 2007; 13: 581-585.
- Mothershed EA, Whitney AM.** Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: present and future considerations for the clinical laboratory. *Clin Chim Acta* 2006; 363:206-20.
- Murata T, Fujitama Y, Yamaga T, Miiyazaki H.** Breath malodor in an asthmatic patient caused by side-effects of medication: a case report and review of the literature. *Oral Dis* 2003; 9: 273-276.
- Mydel P, Takahashi Y, Yumoto H, Sztukowska M, Kubica M, Gibson FC, Kurtz DM Jr, Travis J, Collins LV, Nguyen KA, Genco CA, Potempa J.** Roles of the host oxidative immune response and bacterial antioxidant rubrerythrin during *Porphyromonas gingivalis* infection. *PLoS Pathog* 2006; 2: e76.
- Nakano Y, Yoshimura M, Koga T.** Correlation between oral malodor and periodontal bacteria. *Microbes Infect* 2002; 4:679-83.
- Newman MG, Socransky SS, Savitt ED, Propas DA, Crawford A.** Studies on the microbiology of periodontosis. *J Periodontol* 1976; 47: 373–379.
- Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O.** Sequence specific inhibition of DNA restriction enzyme cleavage by PNA. *Nucleic Acids Res* 1993; 21:197-200.
- Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O.** Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 1991; 254: 1497-1500.
- Nielsen PE, Egholm M.** An introduction to peptide nucleic acid. *Curr Issues Mol Biol* 1999; 1:89–104.
- Nielsen PE.** Peptide nucleic acid: a versatile tool in genetic diagnostics and molecular biology. *Curr Opin Biotechnol* 2001; 12:16-20.
- Nielsen PE.** Structural and biological properties of peptide nucleic acid (PNA). *Pure Appl Chem* 1998; 70:105–110.

Niles HP, Vazquez J, Rustogi KN, Williams M, Gaffar A, Proskin HM. The clinical effectiveness of a dentifrice containing triclosan and a copolymer for providing long-term control of breath odor measured chromatographically. *J Clin Dent* 1999; 10:135-138

Nishida E, Hara Y, Kaneko T, Ikeda Y, Ukai T, Kato I. Bone resorption and local interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta synthesis induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *J Periodont Res* 2001; 36:1-8.

Nogueira-Filho GR, Duarte PM, Toledo S, Tabchoury CPM, Cury JA. Effect of triclosan dentifrices on mouth volatile sulphur compounds and dental plaque trypsin-like activity during experimental gingivitis development. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 1059-1064.

Noiri Y, Li L, Ebisu S. The Localization Of Periodontal-Disease-Associated Bacteria In Human Periodontal Pockets. *J Dent Res* 2001; 80: 1930-1934.

Noiri Y, Ozaki K, Nakae H, Matsuo T, Ebisu S. An immunohistochemical study on the localization of *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus* and *Actinomyces viscosus* in human periodontal pockets. *J Periodont Res* 1997; 32: 598 – 607.

Noiri Y, Li L, Yoshimura F, Ebisu S. Localization of *Porphyromonas gingivalis*-carrying fimbriae in situ in human periodontal pockets. *J Dent Res* 2004; 83:941-945.

Novak KF, Novak MJ. Aggressive Periodontitis. In: Newman M G, Takei HH, Klokkevold PR, Fermin AC. *Carranza's clinical periodontology*. 10th ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2006: 409-413.

O'Brien-Simpson NM, Veith PD, Dashper SG, Reynolds EC. *Porphyromonas gingivalis* gingipains: the molecular teeth of a microbial vampire. *Curr Protein Pept Sci* 2003; 4: 409-426.

Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000 1997; 14: 9-11.

Page RC, Schroeder HE. Current status of host immune response in periodontal disease. *J Periodontol* 1981; 52:477-491.

Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease: a summary of current work. *Lab Invest* 1976; 34:235-249.

Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* 1991; 26: 230-242.

Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA. Mechanisms of action of environmental factors-tobacco smoking. *J Clin Periodontol* 2005; 32 (Suppl 6): 180-195.

Park OJ, Yi H, Jeon JH, Kang SS, Koo KT, Kum KY, Chun J, Yun CH, Han SH. Pyrosequencing Analysis of Subgingival Microbiota in Distinct Periodontal Conditions. *J Dent Res* 2015; 97:921-927.

Paster BJ, Bartoszyk IM, Dewhirst FE. Identification of oral streptococci using PCR-based, reverse-capture, checkerboard hybridization. *Methods Cell Sci* 1998; 20: 223-231.

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001; 183: 3770-3783.

Paster BJ, Dewhirst FE. Molecular microbial diagnosis. *Periodontol* 2000 2009; 51:38-44.

Payne WA, Page RC, Ogilvie AL, Hall WB. Histopathological features of the initial and early stages of

experimental gingivitis in man. *J Periodontol Res* 1975; 10:51-64.

Pereira F, Carneiro J, Amorim A. Identification of species with DNA-based technology: current progress and challenges. *Recent Pat DNA Gene Seq* 2008; 2:187-99.

Peruski AH, Peruski LF Jr. Immunological methods for detection and identification of infectious disease and biological warfare agents. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10:506-513.

Pollanen MT, Salonen JI, Uitto V. Structure and function of the tooth-epithelial interface in health and disease. *Periodontol 2000* 2003; 31: 12-31.

Quirynen M, Zhao H, Soers C, Dekeyser C, Pauwels M, Coucke W, Steenberghe D. The impact of periodontal therapy and the adjunctive effects of antiseptics on breath odor related outcomes variables: a double-blind randomized study. *J Periodontol* 2005; 76: 705-712.

Quirynen M, Zhao H, van Steenberghe D. Review of the treatment strategies for oral malodor. *Clin Oral Invest* 2002; 6: 1-10.

Quirynen M, Teughels W, Haake SK, Newman MG. Microbiology of periodontal diseases. In: Newman M G, Takei HH, Klokkevold PR, Fermin AC. *Carranza's clinical periodontology*. 10th ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2006: 134-169.

Rabensteiner J, Theiler G, Duettmann W, Zollner-Schwetz I, Hoenigl M, Valentin T, Leitner E, Luxner J, Grisold A, Valentin A, Neumeister P, Krause R. Detection of central venous catheter-related bloodstream infections in haematooncological patients. *Eur J Clin Invest* 2015; 8. doi: 10.1111/eci.12477. [Epub ahead of print].

Raja M, Ummer F, Dhivakar CP. *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* – A Tooth Killer? *J Clin Diagn Res* 2014; 8:ZE13-16.

Ranney RR. Pathogenesis of periodontal disease. In: International Conference on Research in the Biology of Periodontal Disease. Chicago: College of Dentistry University of Illinois, 1977: 223-300.

Rautemaa R, Järvensivu A, Kari K, Wahlgren J, DeCarlo A, Richardson M, Sorsa T. Intracellular localization of Porphyromonas gingivalis thiol proteinase in periodontal tissues of chronic periodontitis patients. *Oral Dis* 2004; 10: 298 – 305.

Reed SG, Lopatin DE, Foxman B, Burt BA. *Oral Chlamydia trachomatis* in patients with established periodontitis. *Clin Oral Invest* 2000; 4: 226-232

Reynolds JJ, Meikle MC. Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontol 2000* 1997; 14: 144-157.

Riviere GR, Smith KS, Tzagaroulaki E, Kay SL, Zhu X, DeRouen TA, Adams DF. Periodontal status and detection frequency of bacteria at sites of periodontal health and gingivitis. *J Periodontol* 1996; 67: 109 – 115.

Riviere GR, Weisz KS, Simomson LG, Lukhart SA. Pathogen-related spirochetes identified within gingival tissue from patients with acute necrotizing ulcerative gingivitis. *Infect Immun* 1991; 59: 2653-2657

Roberts HM, Ling MR, Insall R, Kalna G, Spengler J, Grant MM, Chapple IL. Impaired neutrophil directional chemotactic accuracy in chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2015; 42:1-11.

Rodrigues AS, Lourenção DS, Lima Neto LG, Pannuti CM, Hirata RD, Hirata MH, Lotufo RF, De Micheli G. Clinical and microbiologic evaluation, by real-time polymerase chain reaction, of non-surgical

treatment of aggressive periodontitis associated with amoxicillin and metronidazole. *J Periodontol* 2012; 83:744– 752.

Roldán S, Herrera D, Santa-Cruz I, O'Connor A, González I, Sanz M. Comparative effects of diferente chlorhexidine mouth-rinse formulations on volatile sulphur compounds and salivar bacterial counts. *J Clin Periodontol* 2004; 34: 1128-1134.

Roldán S, Winkel EG, Herrera D, Sanz M, Van Winkelhoff AJ. The effects of a new mouthrinse containing chlorhexidine, cetylpyridinium chloride and zinc lactate on the microflora of oral halitosis patients: a dual-centre, double-blind placebo-controlled study. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 427-434.

Rosenberg M, Septon I, Eli I, Bar-Ness R, Gelernter I, Brenner S, Gabbay J. Halitosis measurement by an industrial sulphide monitor. *J Periodontol* 1991; 62: 487–489.

Rösing CK, Jonski G, Rolla G. Comparative analysis of some mouthrinses on the production of volatile sulfur-containing compounds. *Acta Odontol Scand* 2002; 60: 10 –12.

Rudney JD, Chen R, Sedgewick GJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerell forsythensis* are components of a polymicrobial intracellular flora within human buccal cells. *J Dent Res* 2005a; 84: 59-63.

Rudney JD, Chen R, Sedgewick GJ. Intracellular *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in buccal epithelial cells collected from human subjects. *Infect Immun* 2001; 69:2700-2707.

Rudney JD, Chen R, Zhang G. Streptococci dominate the diverse flora within buccal cells. *J Dent Res* 2005b; 84:1165-1171.

Rurenga P, Raangs E, Singadji Z, Wekema-Mulder G, Veloo AC, van Winkelhoff AJ. Evaluation of three selective media for isolation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res* 2013; 48:549-552.

Saad S, Greenman J, Shaw H. Comparative effects of various commercially available mouthrinse formulations on oral malodor. *Oral Dis* 2011; 17: 180-186.

Saglie FR, Marfany A, Camargo P. Intragingival occurrence of actinobacillus actinomycetemcomitans and bacteroides gingivalis in active destructive periodontal lesions. *J Periodontol* 1988 a; 59: 259 - 265.

Saglie FR, Carranza FA Jr, Newman MG. The presence of bacteria within the oral epithelium in periodontal disease. I. A scanning and transmission electron microscopic study. *J Periodontol* 1985; 56: 618-624.

Saglie FR, Pertuiset J, Rezende MT, Nestor M, Marfany A, Cheng J. In situ correlative immune-identification of mononuclear infiltrates and invasive bacteria in diseased gingival. *J Periodontol* 1988 b; 59: 688-96.

Saglie FR, Pertuiset JH, Smith CT, Nestor MG, Carranza FA Jr, Newman MG, Rezende MT, Nisengard R. The presence of bacteria in the oral epithelium in periodontal disease. III. Correlation with Langerhans cells. *J Periodontol* 1987; 58: 417- 422.

Saglie FR, Carranza FA Jr, Newman MG, Cheng L, Lewin KJ. Identification of tissue-invading bacteria in human periodontal disease. *J Periodontal Res* 1982a; 17:452-455.

Saglie FR, Newman MG, Carranza FA Jr, Pattison GL. Bacterial invasion of gingival in advanced periodontitis in humans. *J Periodontol* 1982b; 53:217-222.

Saito A, Inagaki S, Ishihara K. Differential ability of periodontopathic bacteria to modulate invasion of human gingival epithelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Microb Pathog* 2009; 47: 329 – 333.

Sakamoto M, Huang Y, Ohnishi M, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Changes in oral microbial profiles after periodontal treatment as determined by molecular analysis of 16S rRNA genes. *J Med Microbiol* 2004; 53(pt 6): 563-571.

Sakamoto M, Takeuchi Y, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real-time PCR. *Microbiol Immunol* 2001; 45: 39-44.

Salvi GE, Carollo-Bittel B, Lang NP. Effects of diabetes mellitus on periodontal and peri-implant conditions: update on associations and risks. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 398-409.

SantaLucia J Jr., Hicks D. The thermodynamics of DNA structural motifs. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2004; 33:415-440.

Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol* 2004; 31:1034-1047.

Sanz M, van Winkelhoff AJ. Periodontal infections: understanding the complexity –Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 2011; 38 (Suppl. 11): 3-6.

Sanz M, Teughels W; Group A of European Workshop on Periodontology. Innovations in non-surgical periodontal therapy:Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 2008; 35(8 Suppl):3-7.

Savitt ED, Socransky SS. Distribution of certain subgingival microbial species in selected periodontal conditions. *J Periodontal Res* 1984; 19: 111-123.

Sayehmiri F, Sayehmiri K, Asadollahi K, Soroush S, Bogdanovic L, Jalilian FA, Emaneini M, Taherikalani M. The prevalence rate of *Porphyromonas gingivalis* and its association with cancer: A systematic review and meta-analysis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2015; 28:160-167.

Scannapieco FA. Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Crit Rev Oral Biol Med* 1994; 5: 203-248.

Schenkein HA, Fletcher HM, Bodnar M, Macrina FL. Increased opsonization of a prtH-defective mutant of *Porphyromonas gingivalis* W83 is caused by reduced degradation of complement-derived opsonins. *J Immunol* 1995; 154: 5331-5337.

Schroeder H, Listgarten M. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontol 2000* 1997; 13: 91-120.

Schroeder H, Listgarten M. The junctional epithelium: from strength to defense. *J Dent Res*, 2003; 82:158-161.

Schulz KF, Altman DG, Moher D, CONSORT Group. CONSORT 2010 Statement: Updated Guidelines for Reporting Parallel Group Randomised Trials. *PLoS Med* 2010; 7: e1000251.

Schwartz Z, Goultschin J, Dean DD, Boyan BD. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontol 2000* 1997; 14: 158-172.

Scottish Intercollegiate Guidelines Network. Methodology checklist 4: case-control studies. In: SIGN 50: a guideline developers' handbook. Edinburgh: The Network; 2004. Chapter Annex C

Scully C, Greenman J. Halitosis (breath odor). *Periodontol 2000* 2008; 48:66-75.

Serrano C, Torres N, Bejarano A, Cavie M, Castellanos ME. Clinical and microbiological comparison of three non-surgical protocols for the initial treatment of chronic periodontitis. *J Int Acad Periodontol* 2011; 13:17- 26.

Seymour GJ, Powel RN, Aitken JF. Experimental gingivitis in humans: a clinical and histologic investigation. *J Periodontol* 1983; 54:522-528.

Seymour GJ, Powell RN, Cole KL, Aitken JF, Brooks D, Beckman I, Zola H, Bradley J, Burns GF. Experimental gingivitis in humans: a histochemical and immunological characterization of the lymphoid cell subpopulations. *J Periodontol Res* 1983; 18:375-385.

Shakeel S, Karim S, Ali A. Peptide nucleic acid (PNA) - a review. *J Chem Technol Biotechnol* 2006; 81:892-899.

Sharma NC, Galustians HJ, Oaquis J, Galustians A, Rustogi KN, Petrone ME, Chaknis P, Garcia L, Volpe AR, Proskin HM. The clinical effectiveness of a dentifrice containing triclosan and a copolymer for controlling breath odor measured organoleptically twelve hours after toothbrushing. *J Clin Dent* 1999; 10: 131-134.

Sheets SM, Potempa J, Travis J, Casiano CA, Fletcher HM. Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* W83 induce cell adhesion molecule cleavage and apoptosis in endothelial cells. *Infect Immun* 2005; 73: 1543-1552.

Shimono M, Ishikawa T, Enokiya Y, Muramatsu T, Matsuzaka K, Inoue T, Abiko Y, Yamaza T, Kido MA, Tanaka T, Hashimoto S. Biological characteristics of the junctional epithelium. *J Electron Microscop* (Tokyo) 2003; 52:627-39.

Silva N, Dutzan N, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Aquillon JC, Aravena O, Lastres P, Pozo P, Vernal R, Gamonal J. Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *J Clin Periodontol* 2008; 35(3):206-214.

Silverman AP, Kool ET. Oligonucleotide probes for RNA-targeted fluorescence *in situ* hybridization. *Adv Clin Chem* 2007; 43:79-115.

Simon-Soro A, Mira A. Solving etiology of dental caries. *Trends Microbiol* 2015; 23:76-82.

Sissons CH. Artificial dental plaque biofilm model systems. *Adv Dent Res* 1997; 11: 110-126.

Slots J, Bragd L, Wikström M, Dahle G. The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 570-577.

Slots J, Möenbo D, Langebaek J, Frandsen A. Microbiota of gingivitis in man. *Scand J Dent Res* 1978; 86: 174-181.

Slots J, Reynolds HS, Genco RJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross sectional microbiological investigation. *Infect Immun* 1980; 29: 1013-1020.

Slots J. The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scand J Dent Res* 1976; 84: 1-10.

Smiley CJ, Tracy SL, Abt E, Michalowicz BS, John MT, Gunsolley J, Cobb CM, Rossmann J, Harrel SK, Forrest JL, Hujoel PP, Noraian KW, Greenwell H, Frantsve-Hawley J, Estrich C, Hanson N. Systematic review and meta-analysis on the nonsurgical treatment of chronic periodontitis by means of scaling and root planing with or without adjuncts. *J Am Dent Assoc* 2015; 146:508-524.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 134-144.

Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, Haffajee JA, Uzel NG, Goodson JM. The use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 352-362.

Socransky SS, Haffajee AD. Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal disease: a critical assessment. *J Periodontol Res* 1991; 26: 195-212.

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000* 2005; 38: 135-187.

Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 1994b; 17:788-792.

Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol 2000* 1994 a;5:7-25.

Souza CM, Braosi AP, Luczyszyn SM, Casagrande RW, Pecoits-Filho R, Riella MC, Ignácio SA, Trevilatto PC. Oral health in Brazilian patients with chronic renal disease. *Rev Med Chil* 2008; 136:741-746.

Sreenivasan PK, Furgang D, Zhang Y, DeVizio W, Fine DH. Antimicrobial effects of a new therapeutic liquid dentifrice formulation on oral bacteria including odorigenic species. *Clin Oral Invest* 2005; 9: 38-45.

Stender H, Fidanca, M, Hyldig-Nielsen JJ, Coull J. PNA for rapid microbiology. *J microbial methods* 2002; 48:1-17.

Stender H. PNA FISH: an intelligent stain for rapid diagnosis of infectious diseases. *Expert Rev Mol Diagn* 2003; 3:649-655.

Stoltenberg JL, Osborn JB, Pihlstrom BL, Herzberg MC, Aeppli DM, Wolff LF, Fischer GE. Association between cigarette smoking, bacterial pathogens, and periodontal status. *J Periodontol* 1993; 64:1225-1230.

Sui W, Ou M, Chen J, Wan Y, Peng H, Qi M, Huang H, Dai Y. Comparison of immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH) assessment for Her-2status in breast cancer. *World J Surg Oncol* 2009; 7:83

Sunde PT, Olsen I, Göbel UB. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of bacteria in periapical lesions of asymptomatic root-filled teeth. *Microbiology* 2003; 149(pt 5): 1095-1102.

Sundqvist G, Figdor D, Hanstrom L, Sorlin S, Sandstrom G. Phagocytosis and Virulence of different strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Scand J Dent Res* 1991; 99: 117-129.

Tangerman A, Winkel EG. Intra- and extra-oral halitosis: finding of a new form of extra-oral blood-borne halitosis caused by dimethyl sulphide. *J Clin Periodontol* 2007; 34:748-755.

Teles R, Teles F, Frias-Lopez J, Paster B, Haffajee A. Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontol 2000* 2013; 62: 95-162.

Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological goals of periodontaltherapy. *Periodontol 2000* 2006; 42: 180-218.

Theilade E, Wright WH, Jensen SB, L  e H. Experimental gingivitis in man. II. Longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodontal Res* 1966; 1: 1-13.

Thiha K, Takeuchi Y, Umeda M, Huang Y, Ohnishi M, Ishikawa I. Identification periodontopathic bacteria in gingival tissue of Japanese periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22: 201 – 207.

Tonetti MS, Imboden MA, Lang NP. Neutrophil migration into the gingival sulcus is associated with transepithelial gradients of interleukin-8 and ICAM-1. *J. Periodontol* 1998; 69:1139-1147.

Tonetti MS, Cortellini D, Lang NP. In situ detection of apoptosis at sites of chronic bacterially induced inflammation in human gingival. *Infect Immun* 1998; 66: 5190-5195.

Tonzetich J, Carpenter PAW. Production of volatile sulphur compounds from cysteine, cystine and methionine by human dental plaque. *Arch Oral Biol* 1976; 16:599-607.

Tran SD, Rudney JD. Improved multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3504-3508.

Tribble GD, Lamont RJ. Bacterial invasion of epithelial cells and spreading in periodontal tissue. *Periodontol 2000* 2010; 52: 68 – 83.

Tsai CC, Chou HH, Wu TL, Yang YH, Ho KY, Wu YM, Ho YP. The levels of volatile sulfur compounds in mouth air from patients with chronic periodontitis. *J Periodont Res* 2008; 43:186-193.

Valm AM, Welch M, Borisy GG. CLASI-FISH: principles of combinatorial labeling and spectral imaging. *Syst App Microbiol* 2012; 35:496-502

Van der Sleen MI, Slot DE, Van Trijffel E, Winkel EG, Van der Weijden GA. Effectiveness of mechanical tongue cleaning on breath odour and tongue coating: a systematic review. *Int J Dent Hyg* 2010; 8:258-268.

Van Dyke TE. Neutrophil receptor modulation in the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res* 1984; 63:452-454.

Van Winkelhof AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 1023- 1028.

Vitkov L, Krautgartner WD, Hannig M. Bacterial internalization in periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20: 317-321.

von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, G  tzsche PC, Vandenbroucke JP, STROBE initiative. The strengthening the reporting of observational studies in epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *PLoS Med* 2007; 4: 1623 – 1627.

Wade W. Unculturable bacteria – the uncharacterized organisms that cause oral infections. *J R Soc Med* 2002; 95:81-83.

Wade WG. Has the use of molecular methods for the characterization of the human oral microbiome changed our understanding of the role of bacteria in the pathogenesis of periodontal disease? *J Clin Periodontol* 2011; 38 (Suppl. 11): 7-16.

Wagner M, Horn M, Daims H. Fluorescence *in situ* hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6:302-309.

Walsh LJ. Mast cells and oral inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14:188-198.

Wang D, Koshy G, Nagasawa T, Kawashima Y, Kiji M, Nitta H, Oda S, Ishikawa I. Antibody response after single-visit full-mouth ultrasonic debridement versus quadrant-wise therapy. *J Clin Periodontol* 2006; 33:632-638.

Wang M, Krauss JL, Domon H, Hosur KB, Liang S, Magotti P, Triantafilou M, Triantafilou K, Lambris JD, Hajishengallis G. Microbial hijacking of complement-toll-like receptor crosstalk. *Sci Signal* 2010; 3: ra11.

Wells GA, Shea B, O'Connell D, Peterson J, Welch V, Losos M, Tugwell P. The Newcastle-Ottawa scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomized studies in meta-analysis 2011. Available: www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp. Accessed 1 December 2012.

Winkel EG, Roldan S, van Winkelhoff A J, Herrera D, Sanz M. The clinical effects of a new mouthrinse containing chlorhexidine, cetylpyridinium chloride and zinc lactate on oral halitosis. A dual-center, double-blind placebo-controlled study. *J Clin Periodontol* 2003; 30:300-306.

Wyss C. Dependence of proliferation of *Bacteroides forsythus* on exogenous N-acetylmuramic acid. *Infect Immun* 1989; 57: 1757-1759.

Yang HW, Huang YF, Chou MY. Occurrence of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontally diseased and healthy subjects. *J Periodontol* 2004; 75: 1077-1083.

Yilmaz LS, Okten HE, Noguera DR. Making all parts of the 16S rRNA of *Escherichia coli* accessible *in situ* to single DNA oligonucleotides. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72:733-744.

Yilmaz O, Yao L, Maeda K, Rose TM, Lewis EL, Duman M, Lamont RJ, Ojcius DM. ATP scavenging by the intracellular pathogen *Porphyromonas gingivalis* inhibits P2X7-mediated host-cell apoptosis. *Cell Microbiol* 2008; 10: 863-875.

Yoshimura M, Nakano Y, Yamashita Y, Oho T, Saito T, Koga T. Formation of methyl mercaptan from L-methionine by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 2000; 68:6912-6916.

Young A, Jonski G, Rølla G. Inhibition of orally produced volatile sulfur compounds by zinc, chlorhexidine or cetylpyridinium chloride – effect of concentration. *Eur J Oral Sci* 2003; 111: 400-404.

Zijngel V, Meijer HF, Lie MA, Tromp JA, Degener JE, Harmsen HJ, Abbas F. The recolonization hypothesis in a full-mouth or multiple-session treatment protocol: a blinded, randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2010; 37:518-525.

Zijngel V, van Leeuwen MB, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmür R, Harmsen HJ. Oral Biofilm Architecture on Natural Teeth. *PLoS ONE* 2010; 5: e9321.



Exma. Senhora
Dra. Luzia da Conceição Martins Mendes
Gonçalves
Estudante do Curso de Doutoramento em
Medicina Dentária da Faculdade de Medicina
Dentária da U. Porto

9~1068

22 DEZ. 2011

Assunto: Avaliação pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto do projecto de investigação subordinado ao tema: “Estudo do bio-filme supra-e subgingival em pacientes com periodontite”.

Informo V.Exa. que o projeto supra citado foi:

- Aprovado.

Com os melhores cumprimentos,

O Presidente da Comissão de Ética

António Felino
(Professor Catedrático)

U.PORTO



FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Estudo do biofilme supra- e subgengival em pacientes com periodontite
Luzia Mendes

